

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía
Bucofacial)



**OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL: EFECTO DE LA
ADMINISTRACIÓN LOCAL DE HORMONA DEL
CRECIMIENTO EN EL TEJIDO PERIIMPLANTARIO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elena Martín Monge

Bajo la dirección de los doctores

Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil
Luis Blanco Jerez
Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-2928-6**



OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE HORMONA DEL CRECIMIENTO EN EL TEJIDO PERIIMPLANTARIO

TESIS DOCTORAL

2008

Elena Martín Monge

Directores

Prof. Dr. JA Fernández-Tresguerres Hernández

Dra. I Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

Prof. Dr. Luis Blanco Jerez

*A mi familia, por las horas que he
dejado de estar con ellos, por su amor
y por haberme apoyado siempre.*

A José, que ya no está aquí para verlo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis:

Al Prof. Dr. Jesús A. Fernández-Tresguerres Hernández, por sus sabios consejos y por darme la oportunidad de participar en su grupo de investigación.

A la Dra. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil por enseñarme la constancia y la ilusión por el trabajo de investigación.

Al Prof. Dr. Luis Blanco Jerez, por creer en este proyecto y aportar sus habilidades quirúrgicas y conocimientos científicos.

Y como no, al Prof. Dr. José M^a Sada García-Lomas, por haber sido mi mentor, mi maestro y mi amigo e inculcarme el amor por la docencia. Allá donde estés, gracias.

También quiero agradecer:

A la Profa. Dra. Celia Clemente de Arriba el haberme permitido trabajar en su laboratorio, enseñarme las técnicas histomorfométricas y brindarme su ayuda cuando la he necesitado.

A la Profa. Rosa Rodríguez Torres por su colaboración desinteresada y sus conocimientos sobre densitometría.

A Maite García de Juan por su ayuda inestimable en el laboratorio y en el manejo del densitómetro.

A Profa. Conchita Alonso Rodríguez, porque casi sin conocerme, se volcó en el manejo estadístico de los resultados, muchísimas gracias.

Mi agradecimiento a todo el personal del Animalario de la UCM, en especial a la Dra. M^a Pilar Bringas de la Lastra, Directora Técnica.

Gracias a Juan López-Quiles, a Mónica Montiel y a Carlos Bohm, ellos también aportaron su granito de arena.

Reitero mi agradecimiento a mis padres y a mi hermano, a Toño y a mis pequeños Diego y Alicia, por su tiempo, su apoyo y su paciencia.

Y gracias en definitiva a todas aquellas personas que han hecho posible que este proyecto haya salido a la luz, a todas ellas, muchas gracias.

ÍNDICE

<i>Índice de acrónimos</i>	vii
1. Antecedentes y Justificación	1
2. Hipótesis de trabajo y Objetivos	9
3. Introducción	13
3.1. Hueso	15
3.1.1. <i>Biología ósea</i>	17
3.1.1.1. <i>Macroestructura</i>	17
3.1.1.2. <i>Microestructura</i>	18
A. Células óseas.....	18
B. Matriz orgánica.....	25
B1 Colágeno.....	26
B2 Proteínas no colágenas.....	27
C. Fase mineral.....	27
3.1.2. <i>Metabolismo óseo</i>	29
3.1.2.1. Homeostasis fosfocálcica.....	29
3.1.2.2. Remodelado óseo.....	29
3.2. Osteoporosis	53
3.2.1. <i>Definición</i>	55
3.2.2. <i>Clasificación</i>	57
3.2.3. <i>Epidemiología</i>	58
3.2.4. <i>Etiopatogenia</i>	61
3.2.5. <i>Clínica</i>	63
3.2.6. <i>Diagnóstico</i>	65
3.2.6.1. Medición de la densidad mineral ósea..	65
A. Radiología convencional.....	65
B. Absorciometría dual fotónica de RX (DEXA).....	65
C. Tomografía axial computarizada (TAC).....	65

cuantitativa (QCT).....	70
D. Ultrasonidos (US).....	70
E. Estudio calcemia, calciuria y fosfatemia.....	71
3.2.6.2. Medición de la microestructura.....	72
A. Histomorfometría.....	72
B. MicroTAC.....	75
3.2.7. <i>Tratamiento</i>	76
3.2.7.1. Revisión por grupos terapéuticos de los principales fármacos utilizados en la osteoporosis.....	76
3.3. <i>Hormona del crecimiento</i>.....	85
3.3.1. <i>Estructura química y mecanismo de acción...</i>	87
3.3.1.1. Biosíntesis y secreción. Generalidades.	87
3.3.1.2. Genes para GH.....	89
3.3.1.3. Proteínas transportadoras.....	89
3.3.1.4. Receptores de GH.....	90
3.3.1.5. Control de la secreción de GH.....	93
3.3.1.6. GHRH.....	94
3.3.1.7. Factores metabólicos y secreción de GH.....	96
3.3.1.8. Control central de la secreción de GH..	97
3.3.1.9. Somatomedinas (IGF).....	100
A. Estructura y distribución.....	100
B. Proteínas transportadoras.....	101
C. Receptores de IGF.....	102
D. Control de IGF-I.....	102
E. Acciones biológicas de IGF-I.....	103
3.3.2. <i>Acciones generales de la GH</i>	106
3.3.2.1. Acciones biológicas de GH.....	106
A. Crecimiento.....	106

B. Acciones lipolítica y diabetógena.....	110
C. Acciones sobre el equilibrio electrolítico.....	111
3.3.2.2. Otras acciones de la GH.....	114
3.3.3. Acciones de la GH sobre el hueso.....	117
3.3.3.1. Efectos de la GH sobre el crecimiento longitudinal óseo.....	117
A. La GH y la regulación del crecimiento óseo longitudinal postnatal.....	117
B. Papel fisiológico del IGF-I en el crecimiento óseo.....	118
C. Evaluación de la Teoría de la somatomedina vs. a la Teoría del efector dual.....	119
3.3.3.2. Efectos de GH <i>in vitro</i>	120
3.3.3.3. Efectos de la GH <i>in vivo</i> sobre el metabolismo óseo en animales.....	121
A. Efectos de la diferenciación y del tratamiento con GH sobre el hueso.....	122
B. Efectos del tratamiento con GH en los parámetros óseos de animales con secreción normal de GH.....	122
C. Efectos de la GH en la curación de fracturas..	124
3.3.3.4. Efectos de la GH en el metabolismo óseo en humanos.....	124
A. En pacientes con acromegalia y deficiencia de GH.....	124
B. Efectos del eje GH/IGF-I en el metabolismo óseo y en la masa ósea en pacientes con secreción normal de GH.....	127
4. Material y Metodología.....	131
4.1. Material.....	133
4.1.1. Animales de Experimentación.....	135

4.1.1.1.	Fase de osteoporosis experimental.....	135
4.1.1.2.	Fase de colocación de implantes y aplicación de GH.....	135
4.1.2.	<i>Material Quirúrgico.....</i>	136
4.1.3.	<i>Material para la densitometría.....</i>	136
4.1.4.	<i>Material de experimentación.....</i>	136
4.1.4.1.	Implantes.....	136
4.1.4.2.	Hormona del crecimiento.....	137
4.1.5.	<i>Material histológico.....</i>	137
4.2.	<i>Metodología.....</i>	139
4.2.1.	<i>Metodología de la osteoporosis experimental</i>	141
4.2.1.1.	<i>Animales de experimentación.....</i>	141
4.2.1.2.	<i>Medición de la densidad mineral ósea mediante DEXA.....</i>	141
4.2.1.3.	<i>Fase de ovariectomía más dieta hipocálcica.....</i>	144
4.2.1.4.	<i>Tratamiento estadístico de los resultados.....</i>	146
4.2.2.	<i>Metodología de la fase de colocación de implantes y GH.....</i>	146
4.2.2.1.	<i>Fase de ovariectomía (grupos experimentales).....</i>	146
4.2.2.2.	<i>Cirugía de colocación de implantes...</i>	146
4.2.2.3.	<i>Medición de la densidad mineral ósea mediante DEXA.....</i>	149
4.2.2.4.	<i>Preparación de muestras.....</i>	151
4.2.2.5.	<i>Análisis histomorfométrico.....</i>	153
	A. Microscopía óptica.....	153
	B. Morfometría.....	156
4.2.2.6.	<i>Tratamiento estadístico de los resultados.....</i>	158

5. Resultados.....	159
5.1. Resultados de la fase de osteoporosis experimental.....	161
5.2. Resultados de la fase de colocación implantes-GH.....	167
5.2.1. Análisis Histológico	170
5.2.2. Análisis Histomorfométrico	180
5.2.3. Análisis mediante DEXA	185
6. Discusión.....	191
7. Conclusiones.....	229
8. Bibliografía.....	233

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

1'25(OH)₂ D₃	1'25 – dihidroxivitamina D ₃ o calcitriol
¹²⁵I	Yodo 125
AA	Aminoácidos
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ALS	Unidad ácido lábil
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP	Fostasa alcalina
Arg-Gly-Asp (RGD)	Secuencia Arginina-glicina-asparagina
ATP	Adenosín trifostato
Bcl-2	Proto-oncogen del linfoma de células B
BIC	<i>Bone to impant contact</i> o Porcentaje de osteointegración
Bim	Proteína de dominio homólogo
BMP	Proteína morfogenética ósea
BMU	Unidades multicelulares básicas remodeladoras de hueso
BUA	Atenuación del sonido
Ca	Calcio
Cbfa1	Factor de transcripción de unión al núcleo o <i>core</i>
c-fos	Proto-oncogen perteneciente a la familia de los factores de transcripción
c-jun	Protooncogen nuclear activado por la vía de la JNK
Cm²	Centímetros cuadrados
CMO	contenido mineral óseo
c-myc	Protooncogen nuclear (<i>myc=myelocitomatosis</i>)
Comp.	Comprimidos
COX-2	Cicloxigenasa 2
	Se trata de una herramienta específica para los genes de los tejidos de animales
Cre/loxP	<i>Knock out</i> . Es la proteína recombinante del bacteriófago P1 que se une al loxP (<i>locus</i> del X-ing over)
CT	Calcitonina

CV	Coeficiente de variabilidad
D.E.	Desviación estándar
DA	Dopamina
DCA	DMO de la región CALOTA antes de la OVX menos DMO de la CALOTA tras la OVX,
DCO	DMO de la COLUMNA antes de la OVX menos DMO de la COLUMNA tras la OVX
DMO	Densidad mineral ósea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Absorciometría dual fotónica
DTI	DMO de la región TIBIA antes de la OVX menos DMO de la TIBIA tras la OVX
DXA / DEXA / QDR	Densitometría radiológica de doble energía axial o absorciometría dual de RX
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
e-PTFE	Politetrafluoroetileno expandido
erg1	Gen relacionado con <i>ether-a-go-go</i> 1
ERK	Proteína-kinasa regulada por señal extracelular o del mitógeno activado
<i>et al</i>	Abreviatura de la expresión latina <i>et alii</i> que significa “y otros”
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administración de fármacos y alimentos
FFA	Ácidos grasos
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
g	Gramos
GABA	Ácido gamma amino butírico
GCs	Glucocorticoides
GGPP	<i>Geranyl-geranyl</i> difosfato
GH	Hormona del crecimiento
GHBP	Proteína transportadora de GH
GHD	Deficiencia de GH
GH-N/V	Genes para GH N/V
GHR	Receptor de GH
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento

GM-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos
H⁺	Ión hidrógeno
HA	Hidroxiapatita
HA-GHBP	Proteína transportadora de GH de alta afinidad
hGH	Hormona del crecimiento humana
hMSC	Células troncales mesenquimáticas humanas
ICTP	Telopéptido carboxi-terminal del procolágeno
IFN-γ	Interferón
IGFBP	Proteínas de unión del IGF
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina, tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina, tipo II
IL	Interleuquina
INTP	Telopéptido amino-terminal del procolágeno
IRS1, -2	Substratos -1, -2, del receptor insulínico
JAK	Es un tipo de factor de transcripción
JNK	Janu-kinasa
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
LA-GHBP	Proteína transportadora de GH de baja afinidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LIFT	Estudio a largo plazo sobre el efecto de la tibolona en las fracturas
LPR5	Receptor de lipoproteínas de baja densidad 5
M-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de macrófagos
mg	Miligramos
mmp1B	Metalopeptidasa de la matriz 1B (colagenasa intersticial)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MT1-MMP	Metaloproteína 14 de la matriz
N.S.	No estadísticamente significativo
Na	Sodio

OB	Osteoblastos
OC	Osteoclastos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	Proteína osteogénica
OPG	Osteoprotegerina
Ostn	Osteocrina
OVX	Ovariectomía, ovariectomizado/a
P	Fósforo
p.e. / ej.	Por ejemplo
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PGE	Prostaglandinas
PHI	Péptido histidina isoleucina
PI-3K	Fosfoinositol 3-kinasa
PICP	Propéptido carboxi-terminal del procolágeno
PINP	Propéptido amino-terminal del procolágeno
PTH	Paratohormona y hormona paratiroidea
QCT	Tomografía computarizada cuantitativa
QDR/ DXA / DEXA	Densitometría radiológica de doble energía axial o absorciometría dual de RX
QUS	Ultrasonido cuantitativo
RA	Absorciometría radiológica / fotodensitometría
RANK	Receptor del ligando NF κ B
RANKL	Factor de diferenciación osteoclástica
rhGH	Hormona del crecimiento recombinante humana
RX	Rayos X
SERMS	Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos
SPA	Absorciometría fotónica simple
SS	somatostatina
STAT	Transductor de la señal y activador de transcripción
SXA	Absorciometría por RX de energía simple
T₃	Triyodo tironina

TAC	Tomografía axial computarizada
TC	Tomografía computarizada
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
THS	Terapia hormonal sustitutiva
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
TRAP	Fosfatasa tartrato resistente
U.I.	Unidades internacionales
UAH	Universidad de Alcalá
UCM	Universidad Complutense de Madrid
US	Ultrasonidos
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VOS / SOS	Velocidad del sonido
wk	Kilo de peso
Wnt	Es un tipo de factor de crecimiento aislado en la mosca <i>drosophila</i> sin alas (<i>Wingless</i> + gen <i>int</i>)
μg	Microgramo

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La sustitución de los dientes perdidos mediante implantes osteointegrados constituye uno de los avances odontológicos más importantes de las últimas décadas y es la rama de la Odontología que más se ha desarrollado en los últimos 15 años. Existen una serie de factores combinados que fomentan la necesidad y el empleo de estos tratamientos. Una población cada vez más envejecida y con una esperanza de vida mayor, a la que se asocia una pérdida de dientes causada por la edad y las alteraciones estéticas y psicológicas de la misma, exige tratamientos que reestablezcan su silueta, función, comodidad, estética, habla y salud normales; sin embargo, cuanto mayor es el número de dientes que faltan y mayor es el tiempo de edentación, más difícil es alcanzar los objetivos estéticos y funcionales respecto a la odontología tradicional. Por otro lado, los fracasos en las prótesis convencionales (fijas y removibles) frente a los resultados predecibles y las ventajas de las rehabilitaciones sobre implantes justifican la utilización de los mismos (Mich, 2006).

Para el éxito del tratamiento implantológico es imprescindible la unión firme, estable y duradera del implante al sustrato óseo, es decir, es imprescindible la presencia de una cantidad y calidad mínimas de hueso. El hueso alveolar ligado genéticamente a los dientes va reabsorbiéndose tras las exodoncias debido a la falta de estimulación del hueso residual, lo que origina una disminución de las trabéculas y de la densidad ósea en dicha zona, con pérdida de la anchura externa y luego de la altura del volumen óseo (Pietrokovski, 1975). La anchura del hueso disminuye una cuarta parte durante el primer año tras la pérdida del diente, y unos 4mm de altura media durante ese primer año tras realizar las extracciones (Carlsson, 1967). La pérdida de hueso, aunque a menor velocidad, continúa durante toda la vida.

En consecuencia, en los ancianos, el hueso alveolar está muy disminuido y además de tener reducida la capacidad de regeneración (Sodeck y Cheifetz, 2000) necesaria para

una correcta osteointegración de las fijaciones de titanio, es habitual encontrar una patología concreta, como es la osteoporosis, que se define como una enfermedad sistémica esquelética caracterizada por una masa ósea disminuida con una alteración de la microestructura del hueso, con una disminución del grosor de la cortical y con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad a las fracturas (Osorio y *et al.*, 2003). Por tanto, como parte del proceso natural del envejecimiento, los huesos comienzan a reabsorberse más rápido de lo que las células pueden formar hueso nuevo. La osteoporosis es el proceso metabólico óseo más frecuente y uno de los mayores problemas de salud pública en el momento actual. La incidencia de esta enfermedad aumenta de forma geométrica con la edad, y es más frecuente en el sexo femenino. La pérdida ósea se acelera en las mujeres tras la menopausia, debido a la caída en los niveles de estrógenos. Se estima que hay aproximadamente 400 millones de mujeres en el mundo que están incapacitadas de alguna manera a consecuencia de la osteoporosis postmenopáusica (Kong y Penninger, 2000), y aunque es cuatro veces más frecuente en ellas, los varones también se ven afectados. Según Kanis, una de cada tres mujeres mayores de 65 años padece esta enfermedad (Kanis, 1996).

Se ha investigado sobre la asociación entre el estado del hueso alveolar y la masa ósea en otras localizaciones esqueléticas, ya que si la osteoporosis afecta fundamentalmente a las vértebras y a los huesos largos, también podría evidenciarse en otras partes de la economía, incluyendo los huesos maxilares, ya que en estudios en ratas ovariectomizadas se ha demostrado que el déficit estrogénico a largo plazo disminuye el grosor de la cortical mandibular (Yang *et al.*, 2005). Se ha intentado evaluar la osteoporosis en los huesos maxilares mediante distintos mecanismos (White y *et al.*, 2005), pero los resultados obtenidos son controvertidos, probablemente debido a las diferencias en los métodos de medición (Bodic y *et al.*, 2005). Se sabe que los factores mecánicos

(estabilidad primaria) y biológicos (capacidad de regeneración) implicados en los procesos de osteointegración están ciertamente alterados en la osteoporosis postmenopáusica y senil (Marco y *et al.*, 2005) y muchos clínicos e investigadores han observado que la curación ósea con biomateriales es más lenta en los sujetos osteoporóticos, con un aumento de la tasa de fracasos de los tratamientos implanto-protésicos (Fini y *et al.*, 2004; Duarte y *et al.*, 2005). En la literatura se describe que la presencia de osteoporosis puede alterar los procesos reparativos alrededor de los implantes (Fujimoto *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1997; Lugero *et al.*, 2000).

La medición de la densidad mineral ósea en la osteoporosis mediante el análisis con absorciometría dual fotónica de rayos X (DEXA) es una herramienta de gran precisión superior a otros procedimientos no invasivos (Guglielmi, 1995; Lang *et al.*, 1991; Faulkner *et al.*, 1991). Estudios comparativos han demostrado una excelente correlación en las medidas *in vivo* e *in vitro* de la masa ósea entre las distintas generaciones de sistemas DEXA (Faulkner *et al.*, 1991, 1993; Dal Mas *et al.*, 2002) obtenidas mediante el densitómetro Norland XR-26 ® (versión 2.3) que se ha utilizado en este trabajo

Es bien sabido que la hormona del crecimiento tiene una gran importancia en el crecimiento longitudinal del hueso y que estimula la diferenciación y proliferación de los osteoblastos *in vitro*, seguramente interactuando con las células progenitoras (Kassem *et al.*, 1994) y a través del IGF tiene acción anabólica sobre los mismos. También regula la formación de osteoclastos, tanto el mecanismo estimulador como el inhibidor, probablemente debido a las diferencias existentes en las condiciones de los cultivos (Nishiyama *et al.*, 1996. Mochizuki *et al.*, 1992) y actúa en la estimulación de células fagocíticas (Warwick *et al.*, 1995).

Por otro lado, se ha visto que el envejecimiento humano causa cambios en la composición corporal (atrofia muscular y aumento de la grasa), una disminución de la

densidad mineral ósea, un deterioro de la forma física y un empeoramiento del perfil de riesgo cardiovascular, con aumento de la morbilidad y mortalidad. Además, la secreción endógena de GH y de IGF disminuye de forma fisiológica con la edad, sobre todo a partir de los 60 años, por lo que el envejecimiento podría considerarse como una forma de déficit de GH (Toogood, 2004). Parte de estas situaciones revierten con la administración de GH exógena (Marcus *et al.*, 1990; Rudman *et al.*, 1990), aunque su uso sistémico es todavía controvertido (Toogood, 2004).

En pacientes con déficit de GH se produce una disminución de la densidad mineral ósea igual que ocurre en la vejez (Rosen y *et al.*, 1993), y la administración de GH sistémica consigue aumentar los valores séricos de calcio, fosfato y osteocalcina (Whitehead y *et al.*, 1992; Holmes y *et al.*, 1995), además de acelerar el *turn-over* óseo, ya que incrementa la síntesis de proteínas (sobre todo las de la matriz ósea) y la mineralización (Degerblad *et al.*, 1995; Canalis y *et al.*, 1989).

En cuanto a la curación de fracturas, se ha demostrado en diversos experimentos animales que la administración sistémica de GH tras la fractura tibial experimental consigue aumentar la rigidez y la capacidad de carga (Bak *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 1991), tanto si se da al principio del tratamiento como si se administra a lo largo de toda la terapia (Bak *et al.*, 1991) y que se estimula la formación del callo de fractura y la osificación en las etapas tempranas de la curación ósea (Kolbeck *et al.*, 2003), encontrando resultados similares en estudios con animales viejos (Bak y Andreassen, 1991; Andreassen *et al.*, 1995).

Pero sus efectos sobre la osteointegración de fijaciones de titanio en situaciones de osteopenia / osteoporosis aplicada de forma local está muy poco estudiada (Guicheux *et al.*, 1998; Blom *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005).

Se han desarrollado diferentes modelos animales para determinar la relación entre la pérdida de hueso y la osteoporosis. El animal ovariectomizado (OVX) se ha utilizado ampliamente como modelo de osteoporosis postmenopáusica, ya que la osteopenia que se desarrolla tras la ovariectomía tiene muchas similitudes con la que se produce en los humanos (Cao y *et al.*, 2001; 2004). El modelo de rata ovariectomizada ha sido el más utilizado (Fini *et al.*, 2004; Namkung-Matthai *et al.*, 2001, Ortoft y Oxlund, 1996; Duarte *et al.*, 2005). Narai y Nagahata (2003) publicaron que es posible la colocación de implantes en la rata ovariectomizada suministrándole el tratamiento de la osteoporosis. Sin embargo, el conejo parece un modelo más apropiado para el estudio del pico de masa ósea, porque al contrario de lo que sucede en los roedores, los conejos terminan de crecer y exhiben madurez esquelética (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Mori *et al.*, 1997; Norris *et al.*, 2001). Los modelos experimentales de osteoporosis en conejo pueden ser muy útiles, especialmente para investigar agentes con propiedades anabólicas. La administración de corticosteroides y la ovariectomía son los principales modelos de osteoporosis experimental descritos en conejos (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Fujimoto *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005; Mori *et al.*, 1997), pero la inducción de la enfermedad mediante ovariectomía asociada a la dieta hipocálcica en conejos ha sido muy poco estudiada (Mori *et al.*, 1997; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005) y la medición de la DMO mediante DEXA con el aparato NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) no ha sido investigada con anterioridad.

Por todo lo expuesto, creemos que está justificada la realización de esta Tesis Doctoral.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJOS Y OBJETIVOS

En el presente estudio nos planteamos la siguiente **HIPÓTESIS DE TRABAJO**:

La aplicación de una dosis única de 2 U.I. de hormona de crecimiento recombinante humana en el interior del lecho quirúrgico, inmediatamente antes de la inserción de un implante de titanio en la tibia de conejas, a las que se ha inducido un proceso osteoporótico experimental previo mediante ovariectomía y dieta hipocálcica, mejora el proceso de osteointegración.

Con el fin de dar respuesta a esta hipótesis, se desarrolló un trabajo experimental en animales de investigación para alcanzar los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Cuantificar mediante DEXA *in vivo* la DMO en calota, columna y tibia de conejas Nueva Zelanda a las que se ha ovariectomizado y sometido a dieta hipocálcica.
2. Evaluar que en este modelo de osteoporosis se produce la osteointegración a las dos semanas de la inserción de un implante de titanio roscado colocado en el tibia de las conejas, de forma cualitativa (mediante análisis histológico).
3. Valorar de forma cuantitativa, mediante análisis histomorfométrico del hueso en contacto íntimo con el implante (*BIC*) y mediante análisis densitométrico (DEXA) la influencia de la aplicación local de hormona de crecimiento en la osteointegración en un modelo experimental de osteoporosis.
4. Comparar el efecto de la hormona de crecimiento recombinante humana, desde el punto de vista densitométrico, histológico e histomorfométrico entre animales con osteoporosis experimental inducida y animales sanos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1.HUESO

3.1.1. BIOLOGÍA ÓSEA

El hueso es un tejido dinámico, que está en constante formación y destrucción. Desde un punto de vista histológico, es un tejido conjuntivo mineralizado, que está constituido por laminillas de matriz ósea calcificada. Según sea la disposición de éstas, puede ser hueso cortical (laminillas concéntricas formando osteonas) o hueso trabecular (laminillas formando trabéculas).

Constituye el soporte estructural para el cuerpo, protegiendo los órganos internos y alojando la médula ósea en su interior. También funciona como reservorio de iones calcio y fosfato y juega un importante papel en la homeostasis de estos minerales.

3.1.1.1. *Macroestructura:*

Aproximadamente el 80% del esqueleto se compone de **hueso cortical**, que se localiza principalmente en las diáfisis de los huesos largos y en las superficies de los planos. Se trata de hueso compacto, que se deposita de forma concéntrica alrededor de los canales o sistemas Harvesianos, que contienen los vasos sanguíneos, el tejido linfático, los nervios, y el tejido conectivo. El **hueso trabecular** o esponjoso se encuentra principalmente en las epífisis de los huesos largos y en el interior de los huesos cortos, y consta de láminas y celdas interconectadas en cuyo interior se aloja la médula ósea (Wheater *et al.*, 1987). Se halla ordenado en función de las fuerzas de tensión, dotando al armazón óseo de rigidez y resistencia a la compresión.

La ratio superficie/volumen del hueso esponjoso es mucho mayor que en el hueso cortical y, por tanto, el potencial de la actividad metabólica es superior.

3.1.1.2. *Microestructura:*

Tanto el hueso compacto como el trabecular están constituidos por células (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), matriz orgánica y sustancia mineral.

A. Células

En el hueso hay osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Sin embargo, debido a la proximidad de la médula ósea, el hueso está expuesto a la influencia de otro tipo de células que juegan un papel importante tanto en la producción de células osteogénicas como en la regulación del remodelado.

A.1. Los **osteoblastos** son células grandes, de forma poliédrica, con citoplasma basófilo, aparato de Golgi prominente y con un retículo endoplásmico rugoso importante, esencial en la síntesis de proteínas. Pueden ser activos o inactivos (también llamados de revestimiento o células limitantes). Los primeros sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide. Poseen como enzima característica la fosfatasa alcalina. Son células polarizadas, dispuestas en empalizada sobre la matriz y actúan coordinadamente, debido al contacto entre células que tiene lugar a través de unas proteínas transmembrana denominadas “integrinas”, que actúan de enlace entre células o entre la célula y la matriz extracelular (Steinberg *et al.*, 1994). En el caso de los osteoblastos el mediador de la conexión intercelular es la Conexina 43 (Civitelli *et al.*, 1993).

Derivan de las células mesenquimales pluripotenciales (*stem cells*), que pueden diferenciarse también a condrocitos, adipocitos, mioblastos y fibroblastos (Kahn *et al.*, 1995; Connolly, 1995; Sodek y Cheifetz, 2000; Bianco y Gehron Robey, 2000; Friedenstein, 1976; Owen, 1985; Owen y Friedenstein, 1988) (Fig. 1).

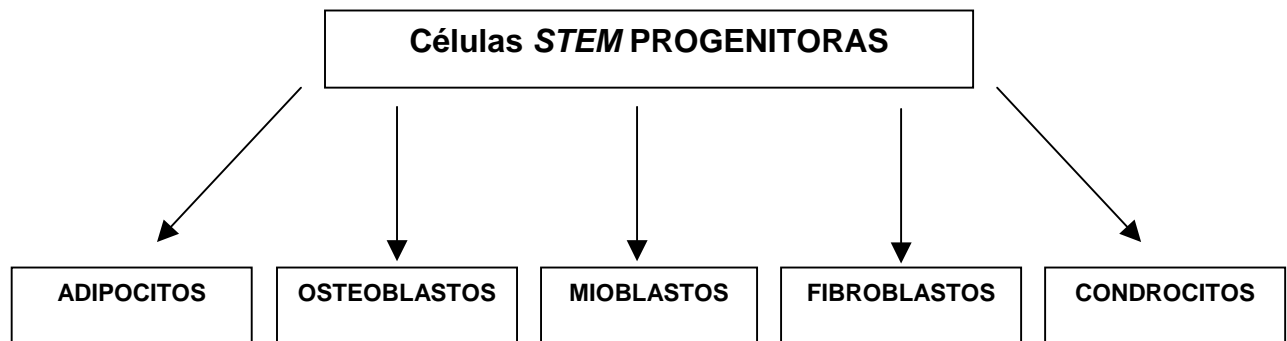


Figura 1. Estirpes celulares desde las *stem cell* mesenquimales pluripotenciales. (Modificado de Compston, 2001)

Se ha descubierto recientemente que el Cbfa 1 (factor de transcripción de unión al *core*) también conocido como Runx2 es esencial para la diferenciación osteoblástica; así, los ratones *knock out* para este gen muestran la ausencia total de osificación del cartílago (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Karsenty 2001) y en humanos la pérdida heterocigótica de esta función causa la displasia cleidocraneal (Mundlos *et al.*, 1997). Además, se necesitan otros factores para la diferenciación normal de los osteoblastos, incluyendo los FGFs, TGF- β , BMPs, glucocorticoides, y 1,25-dihidroxivitamina D (Prieto 1992; Sykaras y Opperman, 2003).

Los osteoblastos que están implicados activamente en la formación ósea se disponen en monocapas de células cuboides-redondeadas en yuxtaposición al hueso neoformado no mineralizado (osteóide) (Steinberg *et al.*, 1994). Los osteoblastos a medida que se diferencian, expresan en su superficie diferentes proteínas o marcadores de diferenciación, como son colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteopontina, y osteocalcina. Muy recientemente, Bord *et al.* (2005) han demostrado la presencia de una molécula activa en el tejido óseo humano, la osteocrina (Ostn), una nueva proteína ósea que se expresa en

los osteoblastos del hueso en formación, y en los puntos de remodelado óseo, lo que sugiere según los autores, un papel importante en la formación ósea. Se puede utilizar como marcador de las células osteoblásticas (se expresa más en los osteoblastos jóvenes) y parece estar relacionada con la actividad de los mismos. Los osteoclastos no se tiñen con osteocrina. En los osteoblastos humanos, la osteocrina sigue un patrón de expresión opuesto al de la fosfatasa alcalina (Bord *et al.*, 2005).

Los osteoblastos que están en periodo de formación activa pueden sufrir apoptosis, transformarse en células limitantes en la superficie ósea o convertirse en osteocitos; trabajos muy recientes sugieren que el TGF β , la metaloproteinasa 14 de la matriz (MT1-MMP) y la esclerostina (Winkler *et al.*, 2005, 2003; Sutherland *et al.*, 2004) pueden actuar como mediadores en este proceso de diferenciación, ya sea de forma individual o en conjunto (Karsdal *et al.*, 2002, 2004); la hilera de células limitantes junto con la membrana forman una capa protectora sobre la superficie y juegan un papel importante en la activación del remodelado óseo (Bord *et al.*, 1996). Un dato interesante es que los osteoblastos, en ciertas zonas del hueso, aparentemente en los puntos de incorporación a la matriz ósea como osteocitos, se tiñen positivamente para la osteocrina, mientras que los osteoblastos de alrededor no muestran tinción, lo que sugiere que posiblemente la Ostn pueda ser un factor de diferenciación del osteoblasto hacia osteocito. Esta inmunorreactividad se mantiene en los osteocitos recién incorporados a la matriz, pero se pierde en los que llevan más tiempo incluidos (Bord *et al.*, 2005).

Respecto a las acciones de los osteoblastos sabemos que (Prieto, 1992):

- a) sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso,
- b) dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular,
- c) contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina,

- d) a través de la síntesis de citoquinas específicas median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos (IL-1,-6 y -11) y en la hematopoyesis (GM-CSF y M-CSF) (Jilka, 1998. Girasole *et al.*, 1994) y
- e) sintetizan factores de crecimiento (PDGF, TGF- β , IGF-I y II).

A.2. Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en **osteocitos**. Éstos son las células más abundantes en la matriz ósea, tienen forma estrellada-aplanada y se sitúan en el interior de lagunas u osteoplasmas, donde se aloja el cuerpo celular y sus prolongaciones citoplasmáticas conectan unas células con otras y con los osteoblastos de la superficie, formando una red a través de los conductos calcóforos; estos conductos están llenos de fluido óseo extracelular con una concentración de calcio y fosfato menor que la del plasma. A través de estas proyecciones se forma un sincitio de células interrelacionadas (vía uniones *gap*), que permite a los osteocitos responder a los estímulos mecánicos de las cargas y transformarlos en señales químicas; a este fenómeno se le conoce como mecanotransducción (Langer 1993; Lanyon 1993). También intervienen en la maduración y mineralización de la matriz (Bilezikian *et al.*, 1996). Al final, los osteocitos terminan de diferenciarse y pueden sufrir apoptosis o ser fagocitados durante el proceso de reabsorción osteoclástica. La esclerostina, que se expresa fuertemente en los osteocitos, es un antagonista de las BMPs, que produce una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina y de la proliferación de las células hMSC, disminuyendo la actividad de los osteoblastos y la diferenciación de los osteoprogenitores y suprimiendo la mineralización de los osteoblastos, por tanto, controlando de forma selectiva la apoptosis celular y la homeostasis ósea (Winkler *et al.*, 2005, 2003; Sutherland *et al.*, 2004).

Se cree que los osteocitos juegan un papel esencial en la respuesta frente a los estímulos mecánicos percibiendo las tensiones mecánicas e iniciando la respuesta apropiada (remodelado o modelado) mediante una serie de mensajeros químicos entre los que están: glucosa 6-fosfatasa deshidrogenasa, el óxido nítrico, y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs).

A.3. Las células encargadas de la reabsorción son los **osteoclastos**. Son células grandes y multinucleadas y derivan de los precursores hematopoyéticos de la línea celular monocito / macrófago (Mundy 1991). Se forman por la fusión de células mononucleares y se caracterizan por la presencia de un borde dentado, consecuencia de las complejas invaginaciones de la membrana plasmática, y un citoesqueleto prominente. Son ricos en enzimas lisosómicas, entre las que destacan la fosfatasa tartrato-resistente (TRAP), la colagenasa y las catepsinas. Durante el proceso de reabsorción ósea, los iones hidrógeno (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II se liberan a través de la membrana plasmática mediante una bomba de protones para disolver el mineral óseo. Posteriormente se liberan las enzimas lisosómicas, como la colagenasa y las catepsinas, que degradan la matriz ósea. Es necesario que los osteoclastos se adhieran a la superficie ósea para que se pueda llevar a cabo la reabsorción, adhesión que está mediada por integrinas, en particular la $\alpha v \beta 3$, que se une a las proteínas de la matriz que contienen la secuencia RGD (Horton *et al.*, 1991); entre los ligandos potenciales se encuentran la osteopontina (Denhardt y Noda, 1998), la sialoproteína ósea, la tromboespondina, la osteonectina, y el colágeno tipo I. Morfológicamente, la unión de los osteoclastos a la superficie ósea se percibe como un anillo captador de actina (Lakkakorpi y Vaananen, 1995) que rodea por completo la membrana dentada de la célula.

Se conoce desde hace tiempo que las células osteoblásticas son esenciales para la osteoclastogénesis. Se ha publicado recientemente que el factor de diferenciación osteoclástica (RANKL) es un activador del receptor del ligando $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (RANK). El RANK es una proteína de transmembrana tipo 1 expresada por los osteoclastos (Troen, 2003; Anderson *et al.*, 1997). La interacción del RANKL con RANK activa una cascada de acontecimientos intracelulares que implica la activación del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y la protein-quinasa JNK y la interacción con los factores asociados al receptor TNF (TRAF_5) (Hofbauer *et al.*, 2000); se produce un aumento de la actividad y del número de osteoclastos. Por otro lado, la osteoprotegerina (OPG), un nuevo miembro de la superfamilia de los receptores de TNF (que se expresa en células del estroma ST2, de médula ósea y en osteoblastos), actúa como un receptor soluble que evita que el RANKL se una y active el RANK en la superficie del osteoclasto (Kong *et al.*, 1999). La producción del M-CSF por parte de las células osteoblásticas del estroma también es esencial para la osteoclastogénesis (Yoshida *et al.*, 1990), aunque al contrario que el RANKL, no parece tener efecto sobre la actividad osteoclástica (Udagawa *et al.*, 1999) (Fig. 2).

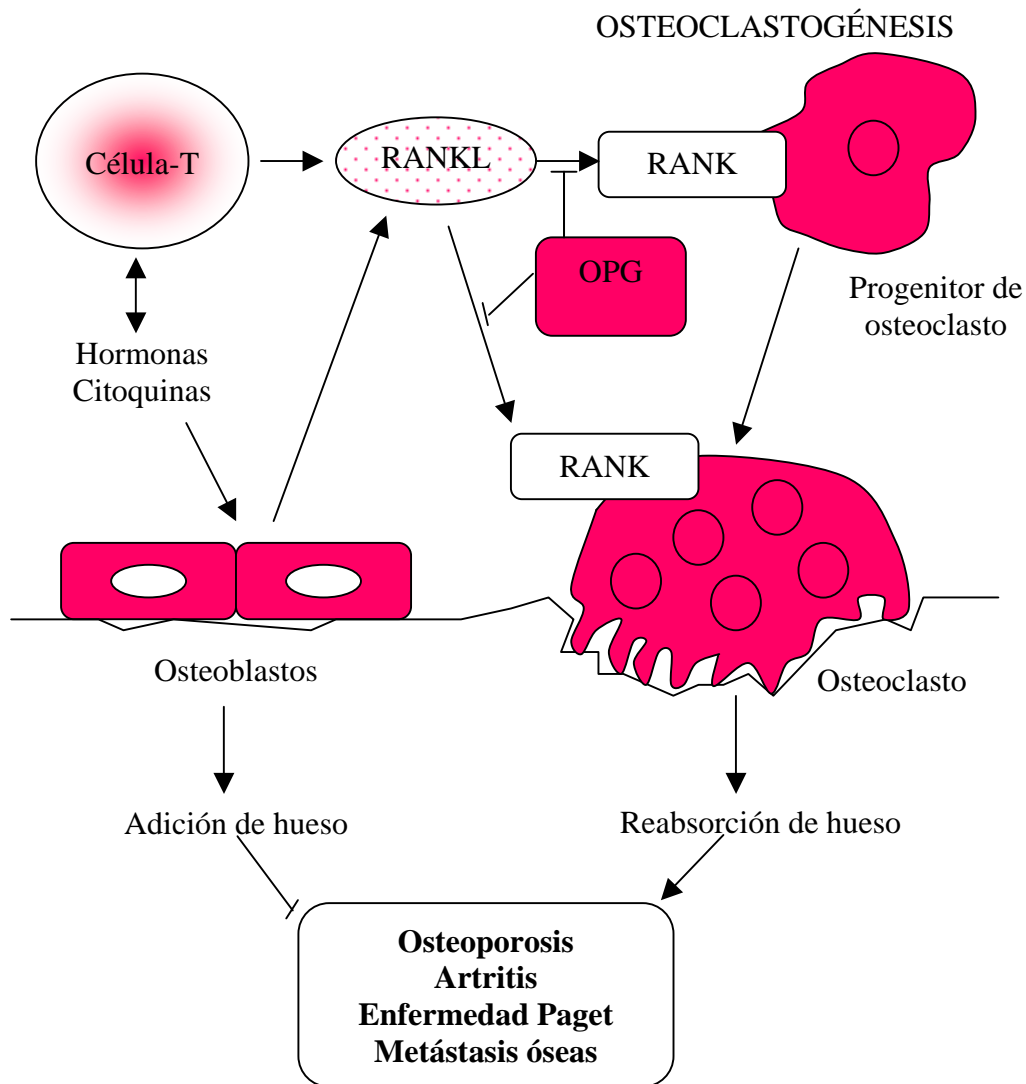


Figura 2. Control molecular del remodelado óseo. (Modificado de Kong y Penninger, 2000).

La apoptosis osteoclástica es un marcador muy importante de la actividad osteoclástica. Al igual que los osteocitos, los osteoclastos son células muy diferenciadas con una esperanza de vida limitada. Las citoquinas IL-1, TNF- α y M-CSF, reducen la apoptosis osteoclástica (Suda *et al.*, 1997) prolongando por tanto la viabilidad de dichas células. Por el contrario, los estrógenos incrementan la apoptosis osteoclástica (Saintier *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado que la apoptosis osteoclástica está regulada por la actividad del ERK, que media en la diferenciación y maduración de los osteoclastos - la fosforilación del ERK es fundamental para la supervivencia de los mismos (Ang *et al.*, 2007)- y por el Bim (un tipo de proteína de dominio homólogo) de la familia del Bcl-2 que regula la vía de la apoptosis mitocondrial y que se expresa en células epiteliales, hematopoyéticas, neuronales y germinales (Akiyama *et al.*, 2005).

A.4. En las áreas de reabsorción se encuentran los **monocitos** y **macrófagos**, que liberan sustancias estimuladoras de la reabsorción: GM-CSF, TNF- α e IL-1, -6 y -11. Además se pueden hallar **linfocitos**, productores de Interferón- γ que se encargan de inhibir la diferenciación de los osteoclastos y la acción de la IL-1; pero que también fabrican TNF- β , que al igual que el α , estimula la reabsorción (Hurley *et al.*, 1998).

B. *Matriz orgánica*

Fue Virchow en 1853 el primero en describir la matriz orgánica o **sustancia osteoide**, que supone un tercio del peso total del hueso. Está constituida principalmente por proteínas, de las cuales la más abundante es el **colágeno** (90%) (Tabla I).

Tabla I. Proteínas de la matriz osteoide (Tresguerres, 1999)	
COLÁGENO	90%
PROTEOGLICANOS	1%
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ CARBOXY-GLUTÁMICO	1.7%
GLICOPROTEÍNAS	3.7%
ALBÚMINA	0.3%

B.1. Colágeno

En un 90% está formado por colágeno tipo I y existen pequeñas proporciones de colágeno tipo III y V, probablemente procedentes de los vasos sanguíneos que vascularizan el hueso (Gehron Robey *et al.*, 1993). En el colágeno se hallan los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo este último un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno. Se ha comprobado que su tasa de excreción urinaria se relaciona directamente con la cantidad de reabsorción ósea (Schonau y Rauch, 1997). El colágeno contiene la secuencia RGD que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas (Gehron Robey *et al.*, 1993). La unidad de colágeno o tropocolágeno está constituida por tres cadenas polipeptídicas, dos alfa-1 y una alfa-2. Las fibrillas de colágeno se forman por la unión de varias moléculas de tropocolágeno gracias a la glicosilación y formación de enlaces y a su vez, estas fibrillas se agrupan para formar haces y varios haces constituyen las fibras de colágeno. Finalmente, éstas se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y por la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas.

Puesto que el colágeno no tiene afinidad por el calcio, son otras proteínas las implicadas en el depósito mineral (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, etc.)

B.2. Proteínas no colágenas

Son las siguientes (Tabla II):

Tabla II. Proteínas no colágenas de la matriz (Tresguerres, 1999)	
PROTEOGLICANOS	<ul style="list-style-type: none"> • CONDROITIN SULFATO • DECORINA • BIGLICANO • HIALURONANO
PROTEÍNAS con ácido γ -CARBOXI-GLUTÁMICO	<ul style="list-style-type: none"> • OSTEOCALCINA • PROTEÍNA de la matriz con ácido γ-carboxi-glutámico
GLICOPROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none"> • OSTEONECTINA • FOSFATASA ALCALINA • PROTEÍNAS con RGD: <ul style="list-style-type: none"> FIBRONECTINA TROMBOSPONDINA OSTEOPONTINA VITRONECTINA SIALOPROTEÍNAS ÓSEAS
PROTEÍNAS del plasma	<ul style="list-style-type: none"> • ALBÚMINA • 2-SH- glicoproteína
FACTORES DE CRECIMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I y II • TGF-β • PDGF

C. Fase mineral

El componente mineral supone un 65% del peso del hueso. Lo constituyen fundamentalmente calcio, fosfato y carbonato en diferentes proporciones (10:6:1) que precipitan en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y en menor proporción, magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. Aunque la hidroxiapatita es la principal fase mineral del hueso, también se hallan cristales de brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y de fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Pérez Casas y Bengoechea, 1975). Los

prismas de hidroxiapatita, de forma hexagonal, se adaptan a la orientación de las fibras de colágeno. Por otra parte, debido a la sobresaturación de calcio y fósforo del plasma respecto a la hidroxiapatita, deben existir sustancias que inhiban la mineralización, como los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato, siendo las proteínas con capacidad adhesiva las que la favorecen (Posner, 1985).

Los osteoblastos son los encargados de mineralizar la matriz ósea, ya que controlan la presencia de las proteínas que inhiben y/o fomentan la mineralización y regulan localmente la concentración de iones (Prieto, 1992). El primer paso es la síntesis de osteoide por parte de los osteoblastos, sustancia que se va acumulando en unas vesículas, en las que además hay fosfatasa alcalina y fosfolípidos ácidos con afinidad por el calcio; posteriormente entran en contacto con la cara interna de la membrana celular osteoblástica. Se produce la hidrólisis de los ésteres fosfóricos y se libera fosfato, imprescindible para que se origine el mineral de fosfato cálcico amorfo, que cristaliza posteriormente. Tras el acúmulo masivo de cristales, llega un momento en que se perforan las finas paredes de la vesícula y salen al exterior, precipitando entre las fibrillas de colágeno. Puesto que estas fibras no tienen afinidad por el calcio ni el fosfato, en el interior de las vesículas se encuentran unas proteínas no colágenas que favorecen la rápida cristalización del mineral (en cuanto se desprende de la vesícula) y su depósito sobre el tejido osteoide (osteopontina, osteocalcina y sialoproteína ósea).

La primera fase de la mineralización que supone un 65%, depende de la acción de los osteoblastos, pero la segunda fase (35%) consiste en el crecimiento de los cristales durante meses, por tanto es un proceso acelular (Roberts, 1988).

3.1.2. METABOLISMO ÓSEO

Conformar el esqueleto, dar soporte al organismo y albergar el 99% del calcio, que en un adulto sano supone un kilogramo, son las funciones más importantes que posee el hueso; esto es: función estructural, y homeostasis fosfocálcica. Asimismo, el tejido óseo se halla en constante formación y destrucción, fenómeno denominado remodelado.

3.1.2.1. *Homeostasis fosfocálcica*

Se sabe que la reabsorción ósea libera calcio al plasma y que el hueso participa en el transporte de calcio desde el fluido óseo al espacio extracelular. La red de canalículos bañada por este fluido, llega hasta las células de revestimiento, que forman como una membrana en la superficie ósea. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual sale el calcio a través de dicha membrana, pero el hecho es que el calcio abandona el hueso hacia el espacio extracelular (Carmeliet *et al.*, 2003), en función de las necesidades sistémicas.

3.1.2.2. *Remodelado óseo*

El **remodelado** óseo es un fenómeno de superficie. Sirve para mantener la integridad mecánica del esqueleto adulto así como para establecer un mecanismo por el cual los iones calcio y fosfato puedan ser liberados o permanecer en el interior del esqueleto. Consiste en la remoción, por parte del osteoclasto, de un *quantum* de hueso seguido de la formación por parte de los osteoblastos, de tejido osteoide, que posteriormente se mineraliza. Por tanto, la reabsorción siempre precede a la aposición (Fig. 3). Se dice que el esqueleto de un adulto, se renueva completamente cada 10 años.

El hueso está en constante formación y reabsorción lo que se conoce como **proceso de remodelado**. La actividad metabólica del hueso trabecular (25% del total del tejido

óseo) es unas diez veces mayor que la del hueso cortical (75%) debido a que la relación entre superficie y volumen es mayor (aproximadamente un 60% del total). Sin embargo, la superficie disponible para el remodelado (hueso trabecular y cortical endostal) es menor que la disponible para el intercambio iónico, en el que también interviene el fluido extracelular.

Las zonas donde se produce el remodelado óseo se conocen como unidades multicelulares básicas o *BMU* (Brixen *et al.*, 1993). En ellas se encuentran: osteoclastos, macrófagos, preosteoblastos y osteoblastos. Se cree que en los humanos la vida de expansión de cada unidad de remodelación está entre 2 y 8 meses, correspondiendo la mayoría de este periodo a la formación ósea (Parfitt, 1994).

En el humano adulto normal, aproximadamente el 20% de la superficie del hueso esponjoso está sufriendo un proceso de remodelado.

El primer paso en el remodelado implica la activación de la superficie ósea en reposo antes de la reabsorción (Fig. 3). Aunque no se conoce muy bien este proceso de activación, se cree que conlleva la retracción de las células lineales o en empalizada y la digestión de la membrana endostal, esto último posiblemente como resultado de la producción de colagenasa procedente de las células lineales (Bord *et al.*, 1996). Así, los precursores de los osteoclastos son atraídos por la superficie mineralizada expuesta y estimulados a convertirse en osteoclastos funcionales que reabsorben hueso. Se cree que la exposición de la superficie mineralizada mediante este proceso de activación es un requisito esencial para la reabsorción osteoclástica. La presencia de sinusoides capilares en la cercanía de las zonas de remodelado óseo sugiere que los osteoclastos podrían atravesar la pared vascular antes de la reabsorción, más que ser reclutados directamente por la matriz

ósea (Parfitt 1998). Existe una estrecha interdependencia entre la angiogénesis y la osteogénesis en el hueso en desarrollo (Gerber *et al.*, 1999; Horner *et al.*, 1999) una relación que también puede darse en el hueso adulto. Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la fase mineral y a descomponer la matriz osteoide, proceso que es finalizado por los macrófagos y permite la liberación de factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β y PDGF-BB (Lind *et al.*, 1995). Estos factores son quimiotácticos para los osteoblastos y promueven el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, estimulando además su proliferación (Mundy, 1993 b y 1995). Asimismo IGF-I y II y PDGF-AA podrían participar en el reclutamiento de preosteoblastos (Lind *et al.*, 1995), que sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs, responsables de su diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia orgánica que rellenará las zonas horadadas y posteriormente se producirá la mineralización de dicha matriz.

Todavía no se conocen qué factores determinan que en una zona concreta dé comienzo el remodelado. Sin embargo, es probable que la localización de la activación y el proceso de remodelado subsiguiente dependan estrechamente de factores mecánicos y las zonas de adelgazamiento trabecular puedan, por tanto, verse favorecidas (Compston *et al.*, 1989).

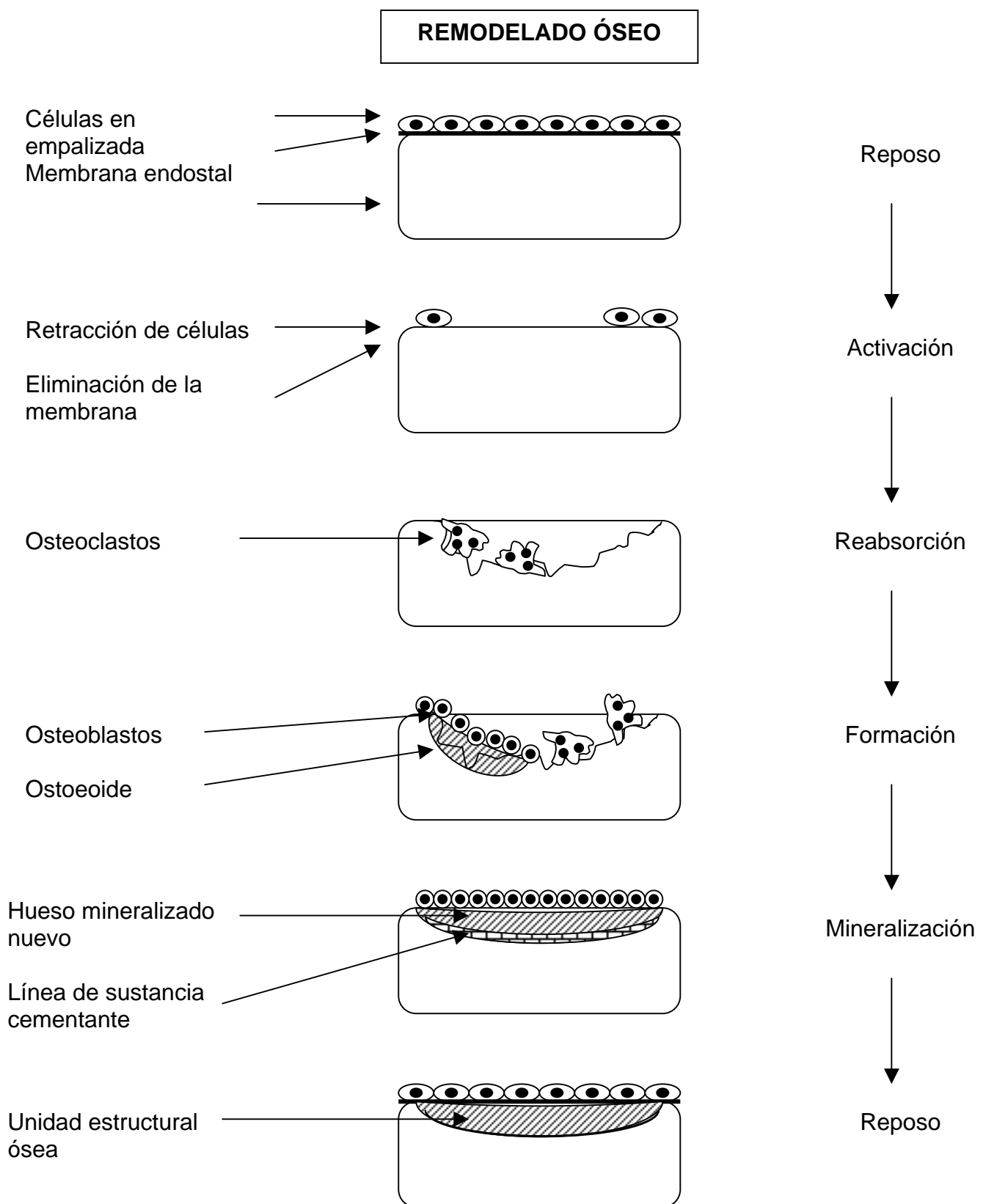


Figura 3. Representación esquemática del remodelado óseo (Modificado de Compston 2001)

El remodelado óseo se produce a lo largo de toda la vida, sin embargo el balance es positivo sólo hasta la tercera década, cuando se da el pico máximo de masa ósea y a partir de aquí, fluctúa ligeramente hasta los 50 años, donde claramente existe ya un predominio de la reabsorción y la masa ósea comienza a disminuir. Tanto la osteoporosis como la enfermedad periodontal constituyen sendos ejemplos de remodelado anormal (Mundy, 1991 y 1993 a).

A. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo

Desde un punto de vista clínico, es interesante conocer los marcadores bioquímicos del *turnover* óseo para valorar el proceso de remodelado. Por un lado, tenemos marcadores de formación ósea, como la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, el PICP (propéptido carboxi-terminal del procolágeno I) y el PINP (propéptido amino-terminal del procolágeno I) y por otro, marcadores de reabsorción, como la hidroxiprolina, ICTP (telopéptido carboxi-terminal del procolágeno I), INTP (telopéptido amino-terminal del procolágeno I) y la fosfatasa ácida resistente a tartrato, TRAP (Russell, 1997). (Tabla III).

Los osteoblastos sintetizan distintos marcadores de osteoformación en función de su estadio de diferenciación. Por ejemplo, durante la proliferación de precursores de osteoblastos comienza la producción de PICP (Lian y Stein, 1993). La fosfatasa alcalina se expresa tras terminar la proliferación celular y cesa cuando comienza la mineralización de la matriz, etapa esta última en la que se expresa la osteocalcina (Schonau y Rauch, 1997).

Tabla III. Marcadores óseos		
	FORMACIÓN	REABSORCIÓN
PLASMA	OSTEOCALCINA	FOSFATASA ACIDA
	PICP	ICTP
	PINP	
	FOSFATASA ALCALINA ÓSEA	
	RATIO CALCIO-CREATININA	
ORINA		HIDROXIPROLINA
		INTP
		CALCIO
		PIRIDINOLINA
		DEOXIPIRIDINOLINA

B. Factores reguladores del remodelado óseo

La regulación del remodelado óseo implica una compleja interconexión entre los factores genéticos, los estímulos mecánicos, los factores vasculares, nutricionales, las hormonas sistémicas, los factores de crecimiento y otros mediadores liberados localmente como las citoquinas (Fig. 4).

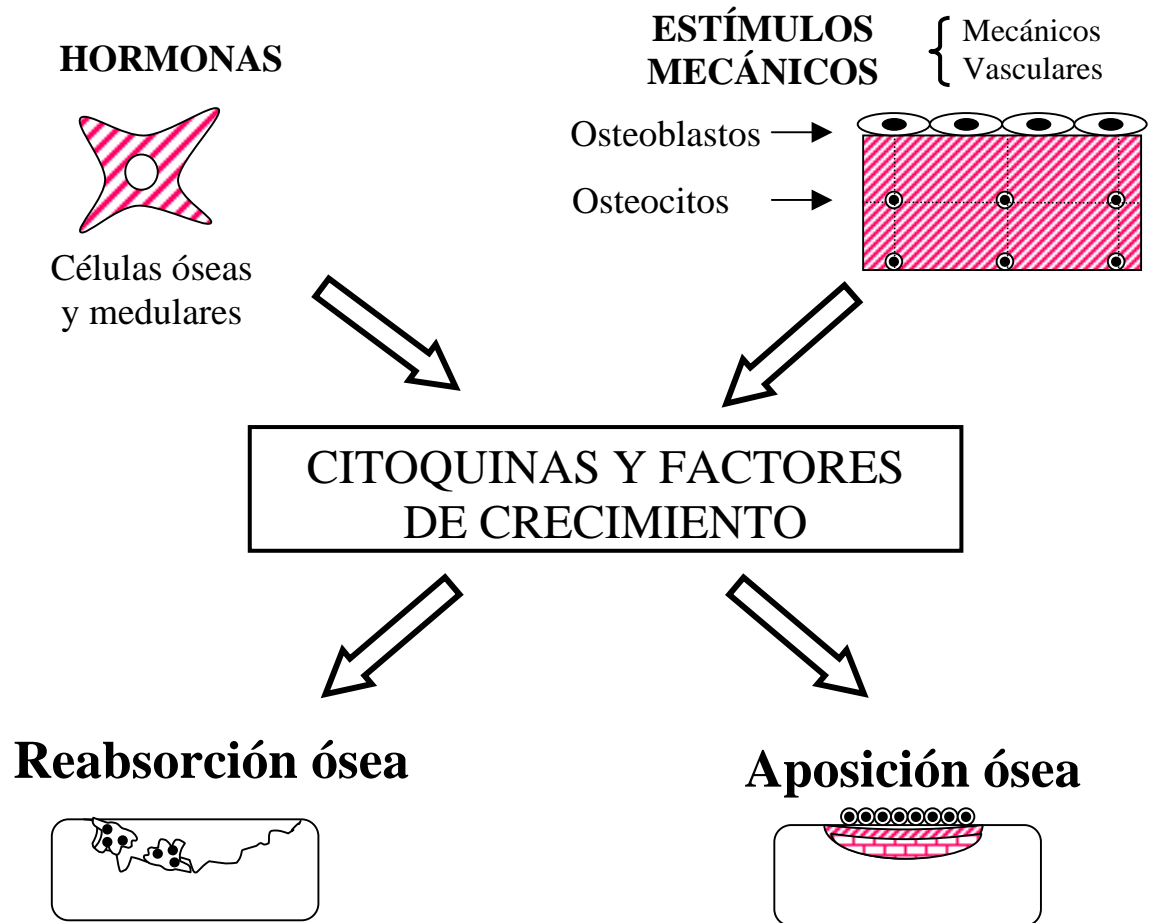


Figura 4: Control del remodelado óseo (Modificado de Compston 2001)

B.1. Factores genéticos

Son los que tienen mayor peso específico. Se sabe que la raza influye en la cantidad de masa ósea: las personas de raza negra tienen mayor masa ósea que las de raza blanca y éstas más que los de raza amarilla; parece ser que debido a la presencia de mayores niveles en suero de la hormona del crecimiento en la raza negra, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo (Wright *et al.*, 1995a, 2002). Por otro lado, se ha visto que existe mayor predisposición a padecer osteoporosis en hijas de madres que la padecen, por tanto, la masa ósea se “hereda” (Pocock *et al.*, 1987).

B.2. Factores mecánicos

Las fuerzas mecánicas son un factor determinante en el modelado y remodelado óseo y está ampliamente aceptado que los osteocitos son las células óseas más mecanosensoriales. La presencia de fuerzas de carga intermitente, dentro de los niveles fisiológicos, dan como resultado unos cambios metabólicos muy rápidos en estas células; una de las primeras manifestaciones es un aumento en la actividad de producción de la glucosa-6-fostatasa deshidrogenasa (Pead *et al.*, 1988). Hasta hoy, no ha sido establecido el mecanismo por el cual los osteocitos captan las cargas mecánicas, pero se cree que la deformación resultante tras la aplicación de fuerzas estimula el flujo del líquido intersticial a través de la red canalicular de los osteocitos (Piekarski y Munro 1977; Klein-Mulend *et al.*, 2005). Los cambios de potencial en la corriente electrocinética y/o los cambios en el fluido como consecuencia de tensiones y fuerzas de cizallamiento pueden modular la producción, por parte del osteocito, de mediadores tales como prostaglandinas (vía COX-2) (Li *et al.*, 2006) y óxido nítrico (Burger *et al.*, 1995; Nijweide *et al.*, 1996). Tanaka y colaboradores (2005) utilizando un modelo de cultivo de osteoblastos en una

matriz colágena en tres dimensiones han demostrado la expresión de los genes para c-fos, *egr1*, *cox2*, osteopontina y *mmp1B* en los osteoblastos sólo una hora después de aplicar tensión al modelo de estudio. Por tanto, estos mediadores pueden estimular la producción de otras citoquinas y factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento similar a la insulina IGF-I (Lean *et al.*, 1995), asociada a una reducción de la expresión de las integrinas (Bikle *et al.*, 2003). Varios trabajos muy recientes afirman que las vías de regulación del receptor estrogénico, del IGF-I, de las BMP y del Wnt (un tipo de factor de crecimiento), están implicadas en los mecanismos de mecanotransducción y que en parte, pueden contribuir a la buena o mala respuesta del hueso frente a la carga (Lau *et al.*, 2006; Pishvaian y Byers, 2007). La vía de señal del Wnt, sobre todo a través de la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR5) parece estar íntimamente relacionada con la regulación de la masa y fuerza óseas, ya que esta proteína transmembrana LPR5 es un mediador de la función de los osteoblastos maduros tras la carga (Sawakami *et al.*, 2006).

Al realizar ejercicio físico, la acción muscular transmite una tensión al hueso que es detectada por la red canalicular de osteocitos, incrementando tanto su actividad como la de los osteoblastos lo que conlleva una mayor formación ósea. Por el contrario, la ausencia de actividad muscular, el reposo o la falta de gravedad tienen un rápido efecto sobre el hueso, acelerando su reabsorción (Morey y Baylink, 1978; Ohira *et al.*, 2006), posiblemente por un bloqueo en las acciones de IGF-I (Bikle *et al.*, 1995). Según la Ley de Wolff: "el hueso responde en función de las fuerzas que se aplican sobre él"; por lo tanto si hay tensión habrá más formación ósea y si no hay tensión habrá más reabsorción. Bajos niveles de tensión mantenidos crónicamente conducirán a un modelo de «desuso» en el remodelado óseo. En dicho modelo se halla incrementado el *turnover* en todas las superficies óseas, pero en las superficies endostales, aquellas en contacto con la médula ósea, se reabsorbe

más hueso del que se forma. Este desbalance en el remodelado de la superficie endostal inducido por la inactividad es mediado por un factor liberado por la médula ósea, llamado Rho. Frost formuló la hipótesis de que el déficit de estrógenos altera el funcionamiento del mecanostato, disminuyendo la sensibilidad a las señales de tensión (Frost, 1992; 2004). Existe la evidencia de que «el mecanostato» lo componen, al menos en parte, los osteocitos que contienen receptores estrogénicos (Lanyon, 1993). Rho comprende una cascada de citoquinas derivadas de la médula ósea que incluye las citoquinas proinflamatorias y el sistema regulador OPG/RANKL/RANK. Estas citoquinas regulan la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos desde precursores celulares (Hofbauer *et al.*, 1999) y dichos precursores celulares en la médula ósea responden a estrógenos. Por tanto, es admisible que las citoquinas de la médula ósea medien los efectos de los estrógenos y de las tensiones biomecánicas. También se ha comprobado que el estímulo eléctrico activa la formación ósea (Yasuda, 1977).

B.3. Factores vasculonerviosos

Una adecuada vascularización es imprescindible para el desarrollo óseo normal, ya que de la sangre obtiene todo lo necesario para su formación y reparación (células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento). Se sabe desde los trabajos de Ham (1952) que las células óseas que están a más de 0'5 mm de un capilar sanguíneo, mueren por falta de nutrientes. De hecho, en las primeras etapas de la osificación y del proceso de reparación de fracturas se observa una irrupción de los vasos sanguíneos en el tejido cartilaginoso, que más tarde será sustituido por hueso.

El hueso también recibe sustancias procedentes de las fibras nerviosas, en concreto neuropéptidos como la Sustancia P, que participan en el desarrollo normal del

esqueleto. Quizá por esto cuando se produce la denervación del tejido óseo, se produce un retraso en la formación del callo de fractura y un aumento de la fragilidad.

B.4. Factores nutricionales

Es necesaria una cantidad mínima de calcio para que se pueda producir la mineralización y, sin embargo, un exceso no tiene ninguna repercusión en la masa ósea. Se estima que el mínimo necesario en la dieta es de 1.200 mg. al día hasta los 25 años y después y hasta los 45 no debe ser inferior a 1 g. diario. En mujeres menopáusicas, debe ser al menos de 1.500 mg. diarios de calcio.

Los hábitos tóxicos como el tabaco, la cafeína, el alcohol y el exceso de sal, suponen un factor de riesgo importante y potencialmente modificable, para la aparición de osteopenia (Hopper y Seeman, 1994).

B.5. Factores hormonales

Muchas hormonas sistémicas influyen sobre el modelado y remodelado óseos y el normal desarrollo del esqueleto está condicionado por la normalidad en el sistema endocrino. Además de los esteroides sexuales, es importante la hormona somatotropa (GH) y las hormonas calcitrópicas (PTH, calcitonina y calcitriol), así como los glucocorticoides. Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúan a distancia de su lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (efectos autocrino y paracrino), (Tabla IV).

Tabla IV. Factores hormonales (Modificado de Tresguerres, 1999)

FACTORES HORMONALES	EFFECTOS ÓSEOS
H. TIROIDEAS	<p>↑ MATRIZ OSTEOIDE (por los OB y ↑ IGF-I)</p> <p>↓ MATRIZ OSTEOIDE (↑ n° y función OC)</p>
PTH	↑ REABSORCIÓN
CALCITONINA	<p>↓ REABSORCIÓN</p> <p>↑ MINERALIZACIÓN</p>
1,25 (OH) ₂ D ₃	<p>↑ REABSORCIÓN</p> <p>(según el estado de diferenciación de los OC)</p>
INSULINA	↑ MATRIZ OSTEOIDE
GLUCOCORTICOIDES	↑ REABSORCIÓN
ANDRÓGENOS	↑ FORMACIÓN
ESTRÓGENOS	↑ FORMACIÓN
PROGESTERONA	↑ FORMACIÓN
GH	<p>↑ FORMACIÓN directamente y a través de</p> <p>IGF-I y II</p>

- *Hormonas tiroideas*: ejercen dos acciones contrapuestas sobre el hueso. Por un lado, actúan sobre los osteoblastos favoreciendo la síntesis y la mineralización de la matriz osteoide, estimulando la síntesis de IGF-I y por otro, estimulan directamente la reabsorción ósea, aumentando el número y función de osteoclastos e indirectamente a través de los osteoblastos. Esta es la razón por la que en el hipertiroidismo existe pérdida de masa ósea (Jódar Gimeno *et al.*, 1997).
- *PTH*: conocida como la hormona hipercalcemiente por excelencia, ya que favorece la reabsorción, sin embargo a finales de los años ochenta se descubrió su papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β (Canalis *et al.*, 1989). Los últimos trabajos indican la implicación del gen inducido anabólicamente por PTH en el hueso en la acción anabólica de esta hormona (Robinson *et al.*, 2006).
- *Calcitonina*: se sabe que inhibe la reabsorción obstaculizando la proliferación y la actividad de los osteoclastos, si bien parece tener un efecto muy leve.
- *1,25(OH)₂ vitamina D₃*: en el organismo en general, interviene favoreciendo la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización. Se necesita para el crecimiento normal. En el hueso en particular los efectos son de tipo bifásico, según el estado de diferenciación de los osteoblastos (Lian y Stein, 1993), por un lado parece regular localmente la diferenciación de los osteoclastos (Mundy, 1991) y por otro puede favorecer la reabsorción ósea (Raisz, 1993).
- *Insulina*: estimula directamente la síntesis de matriz ósea e indirectamente, al favorecer el incremento de la síntesis de IGF-I hepática.
- *Glucocorticoides*: disminuyen la formación ósea y aumentan la reabsorción, quizá actuando directamente o indirectamente alterando la absorción intestinal de calcio (Raisz, 1993). En los osteoblastos inhibe la síntesis de IGF-I, aunque en la década pasada se observó que *in vitro* estimulaban la diferenciación de estas células (Lian y Stein, 1993).

- *Andrógenos*: su efecto es anabolizante sobre el hueso. Siempre se dijo que producían el pico de GH de la pubertad, pero hoy se sabe que esta acción está producida por los estrógenos (Compston, 2001).
- *Estrógenos*: incrementan el número y la función de los osteoblastos, favoreciendo la formación del hueso (Chow *et al.*, 1992a y 1992b) y disminuyendo la reabsorción (Compston, 2001).
- *Progesterona*: también tiene un efecto anabolizante sobre el hueso, directamente a través de los osteoblastos e indirectamente mediante la competición por los receptores osteoblásticos de glucocorticoides (Compston, 2001).
- *Hormona de crecimiento*: estimula la actividad de los osteoblastos, generando un aumento en la síntesis de colágeno I, osteocalcina y fosfatasa alcalina (Kassem *et al.*, 1993). También actúa indirectamente al favorecer la síntesis de IGF-I y II por los propios osteoblastos y de IGF-I por el hígado, sustancias que a su vez estimulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

B.6. Factores locales

El hueso es una fuente muy rica de citoquinas y factores de crecimiento (Fig. 5, Tabla V), así como de otros mediadores como prostaglandinas y óxido nítrico. Además, las células del microambiente óseo juegan un papel decisivo en la regulación del remodelado óseo, tanto como fuente de precursores de células óseas, como mediante la producción de citoquinas activas óseas y factores de crecimiento.

Tabla V. Citoquinas y factores de crecimiento que afectan al hueso (Modificado de Tresguerres, 1999)
Estimuladores de la reabsorción ósea
Interleuquinas -1, -6, -8, -11
Factores de necrosis tumoral
Factor de crecimiento epidérmico
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
Factor de crecimiento fibroblástico
Factor inhibidor de la leucemia
Factor estimulante de colonias de macrófagos
Factor estimulante de colonias de macrófagos/granulocitos
Inhibidores de la reabsorción ósea
Interferón
Interleuquina - 4
Estimuladores de la formación ósea
Factores semejantes a la insulina
Factor de crecimiento transformante - β
Factores de crecimiento fibroblástico
Proteínas morfogenéticas óseas

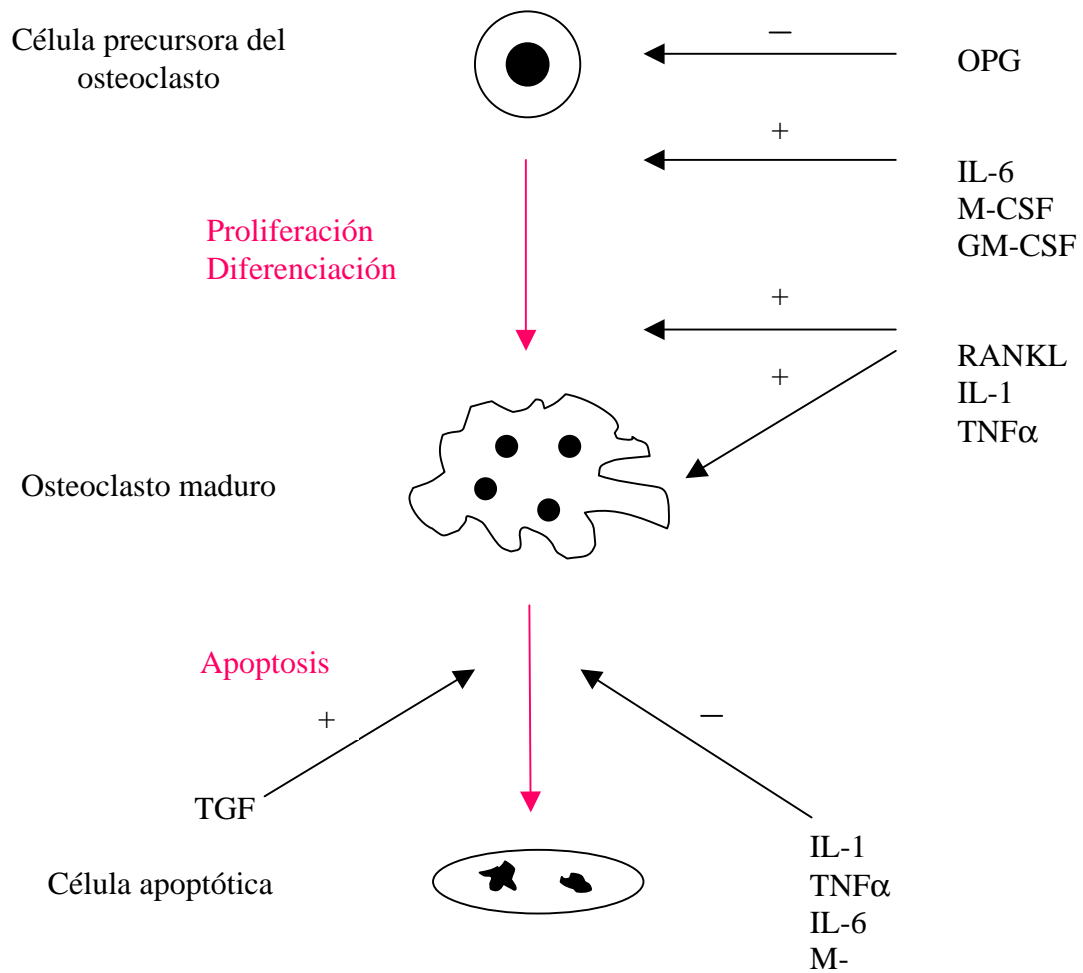


Figura 5. Efectos de las citoquinas sobre los osteoclastos. (Modificado de Compston 2001)

- *Factores de crecimiento:* Son polipéptidos que actúan modulando las funciones celulares (crecimiento y diferenciación) y que son sintetizados por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, (Serrano y Casas, 1997). En el hueso actúan los siguientes:

* *IGF-I y II:* Los IGFs existen en dos formas: IGF-I e IGF-II, siendo éste último el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, pero sus efectos son menores que los del IGF-I (Mohan y Baylink, 1991). En la circulación, forman una estructura compleja de gran peso molecular con proteínas de unión (IGFBPs) y, en el caso de los complejos IGFBP -3 y -5, una subunidad ácido-lábil (Rechler 1993). Los IGFs estimulan la formación ósea y su producción es regulada por células óseas mediante una serie de hormonas sistémicas y factores producidos localmente (hormonas como GH, estrógenos y progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben) (Canalis *et al.*, 1991; Canalis 1996). Incrementan la proliferación de los precursores de osteoblastos y estimulan la síntesis e inhiben la degradación del colágeno tipo I. Los osteoblastos poseen receptores para ellos, sobre los que ejercen una acción mitogénica y diferenciadora (Canalis, 1980; Hock *et al.*, 1988; McCarthy *et al.*, 1989). Asimismo, favorecen la activación de los osteoclastos, mediando en la interacción osteoblasto-osteoclasto e interviniendo de forma activa en el remodelado óseo (Hill *et al.*, 1995). Existen al menos seis IGFBPs (Canalis *et al.*, 1991; Canalis 1996; Lamson *et al.*, 1991) y todas ellas se expresan en las células óseas en varios sistemas *in vitro* (Rosen 1999). Todas las IGFBPs se unen a los IGFs con gran afinidad evitando su interacción con el receptor. Sin embargo, debido a las modificaciones post-translacionales que desembocan en los cambios en las estructuras así como en las funciones, las IGFBPs pueden provocar efectos tanto

inhibidores como estimuladores; esto es, por ejemplo, las IGFBP-1 y -3 poseen un potencial ora estimulador ora inhibidor, las IGFBP-2 y -4 son inhibidoras y la IGFBP-5 es estimulante (Mohan *et al.*, 1995). La IGFBP-6 tiene actividad inhibidora y muestra una afinidad selectiva por IGF- II frente a IGF-I. La complejidad del eje IGF se ve aumentada por la acción de las IGFBP proteasas, que afectan a la capacidad de unión de las IGFBP y que pueden estar reguladas por el propio IGF (Conover 1996; Durham *et al.*, 1994).

* *TGF- β* : La superfamilia de los TGF- β incluye las isoformas TGF- β , activinas e inhibinas y las BMPs (Bonewald 1996). El TGF- β está presente en la matriz ósea (es producido en el propio hueso) en una forma latente, inerte biológicamente y su forma activa se libera en los procesos de reabsorción ósea. (Pfeilschifter y Mundy 1987). Es un potente estimulador de la formación ósea (Noda y Camilliere 1989), incrementando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de proteínas de matriz ósea y sus receptores, mientras que inhibe la síntesis de proteasas así como la actividad de los osteoclastos maduros. Dependiendo de su concentración y de otros factores, puede inhibir la proliferación osteoblástica y promover la reabsorción (Lian y Stein, 1993. Baylink *et al.*, 1993). Existen muchos datos que apoyan los efectos inhibitorios sobre la reabsorción ósea de los osteoblastos (De Souza *et al.*, 1997; Marcelli *et al.*, 1990) debido tanto a los efectos sobre la formación como sobre la actividad de los osteoclastos, esto último mediante la estimulación de la apoptosis osteoclástica (Hughes *et al.*, 1996). Además, inhibe la proliferación epitelial y media en el efecto anabolizante de los andrógenos y en la reabsorción de la PTH y glucocorticoides. Existen tres tipos principales de receptores para TGF β (Cheifetz *et al.*, 1986): los tipos I y II, que son kinasas serina / threamina transmembrana y que funcionan como receptores de

señal (Franzen *et al.*, 1993) y el tipo III, betagliano, que no es de señal (Wang *et al.*, 1991). Se cree que el TGF- β se une directamente al receptor tipo II, que está constitutivamente activo y que posteriormente, este complejo es reconocido por el receptor tipo I, que se fosforila por la acción del receptor tipo II (Wrana *et al.*, 1994).

* *PDGF*: El mayor interés en cuanto a acciones del PDGF se ha centrado en su papel como agente cicatrizante de heridas, dado que sería liberado tras la agregación y degranulación plaquetaria en el sitio de la lesión. Esto provoca una marcada proliferación de los fibroblastos, los cuales tienen una gran sensibilidad al PDGF, y un aumento de la síntesis de colágeno (Dieguez *et al.*, 1992; Nash *et al.*, 1994). En el hueso estimula la síntesis proteica por los osteoblastos, pero también la reabsorción ósea (Centrella *et al.*, 1989), si bien, su papel fisiológico más importante parece ser la replicación celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ello se ha postulado que podría intervenir en la reparación de las fracturas (Prieto, 1992).

* *FGF*: Es el Factor Fibroblástico de Crecimiento y es anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y de las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos del ligamento periodontal (Canalis *et al.*, 1988). Se conocen dos FGF: ácido y básico con notable semejanza estructural entre ellos. Ambos tienen actividad mitógena sobre las células endoteliales vasculares y sobre células de estirpe osteoblástica y favorecen la síntesis de las matrices extracelulares cartilaginosa y ósea. Por su capacidad de estimular la replicación celular y la formación de vasos nuevos, se les atribuye una acción reparadora en heridas y fracturas (Prieto, 1992).

* *VEGF*: Es el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular. Se han llevado a cabo diversos estudios con VEGF para estudiar su efecto sobre la osteogénesis. En un estudio llevado a cabo por Miyanishi y colaboradores (2003) sobre la osteolisis producida por prótesis de titanio fracasadas encontraron un aumento de liberación de VEGF por parte de monocitos / macrófagos en respuesta a los desechos de desgaste de los biomateriales ortopédicos, y concluyeron que este aumento podía contribuir a la osteolisis periprotética y a la pérdida de los implantes ortopédicos. Estos hallazgos se complementan con los encontrados por Eckardt y colaboradores (2003) que estudiaron la angiogénesis terapéutica en un modelo experimental animal de distracción ósea, utilizando una bomba de liberación mini-osmótica de VEGF humano, inhibidor de VEGF y placebo en el defecto de la osteotomía; no encontraron diferencias significativas entre los tres grupos por lo que desaconsejaron la utilización de VEGF para favorecer la formación ósea en este tipo de terapia.

* *EGF*: El Factor de Crecimiento Epidérmico tiene una gran homología con otro factor de crecimiento: el TGF- α , de hecho, ambos polipéptidos ejercen sus acciones a través del mismo receptor y sus efectos biológicos son, al menos cualitativamente, similares. Es sintetizado en un gran número de tejidos del organismo (la mayor producción tiene lugar a nivel de la glándula submaxilar, principalmente del macho) y está presente en diversos fluidos biológicos. Es un potente mitógeno de células y tejidos ectodérmicos y mesodérmicos, tales como células de la musculatura lisa vascular, fibroblastos, etc. Durante el período de desarrollo fetal y neonatal se ha observado que el EGF incrementa el transporte de calcio y el número de receptores de la vitamina D, entre otras muchas acciones (Dieguez *et al.*, 1992).

- * *BMPs*: pertenecen a la superfamilia de los TGF- β . Poseen propiedades osteoinductivas, estimulando la diferenciación de las células precursoras de los osteoblastos y condroblastos y tienen la característica de que pueden iniciar *de novo* la síntesis de hueso y cartílago, a través de la diferenciación de células pluripotenciales. Son similares aunque no idénticas en cuanto a estructura y actividad a los TGF- β (Wozney *et al.*, 1988). Las BMPs actúan como morfogenes durante la embriogénesis, con el patrón de producción de BMPs -2, -4 y -6 que indican su implicación en la formación de cartílago y hueso. Todavía no se han descubierto los mecanismos de regulación y las funciones precisas de las BMPs. Se ha demostrado la estimulación inducida por estrógenos en la producción de mRNA y proteína de BMP-6, en las líneas celulares de osteoblastos humanos (Rikard *et al.*, 1998). Son abundantes en hueso y favorecen la actividad osteoblástica (Reddi y Cunninham, 1993).
- *Citoquinas*: Estos polipéptidos se sintetizan en linfocitos y monocitos. Tienen efecto autocrino, paracrino y endocrino e intervienen en la respuesta inmune, en los procesos inflamatorios y en la hematopoyesis. A nivel óseo, encontramos:

⇒ *Interleuquina 1*: Actúa directamente sobre la reabsorción osteoclástica, si bien no tiene efecto sobre los osteoclastos maduros (Tatakis, 1993). Se trata de tres moléculas relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y Antagonista del receptor de IL-1, que como su nombre indica, es inhibidora del efecto de las otras dos (Mundy, 1993 a y b). Las interleuquinas 1 α y 1 β son unos potentes estimuladores de la reabsorción ósea, *in vivo* e *in vitro* (Boyce *et al.*, 1989; Gowen *et al.*, 1983; Sabatini *et al.*, 1988). Estos efectos tienen lugar tanto por un incremento en la proliferación y diferenciación de los precursores de los osteoclastos, como mediante el aumento de

la actividad osteoclástica (Pfelschifter *et al.*, 1989; Thomson *et al.*, 1986) esto último como resultado, al menos en parte, de los efectos inhibidores sobre la apoptosis de los osteoclastos. Algunos de los efectos de la IL-1 sobre los osteoclastos son consecuencia de un aumento en la síntesis de PGE (Boyce *et al.*, 1989). La IL-1 también tiene efectos sobre los osteoblastos que dependen, probablemente, de si la administración se produce de forma continua o discontinua (Gowen *et al.*, 1985 a y b; Smith *et al.*, 1987). En el primer caso, al administrar de forma continua, se producen efectos inhibidores sobre la formación de hueso, mientras que la administración intermitente se asocia con un aumento en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) es un inhibidor de IL-1 que se da de forma constitutiva (Hannum *et al.*, 1990) y actúa bloqueando la estimulación de la reabsorción ósea inducida por IL-1 tanto *in vitro* (Seckinger *et al.*, 1990) como *in vivo* (Guise *et al.*, 1993).

⇒ *Interleuquina 6*: también favorece la reabsorción ósea, aunque mediante mecanismos diferentes y se ha implicado en la patogenia de la enfermedad de Paget (Roodman *et al.*, 1992). Su producción en hueso aumenta gracias a otras citoquinas favorecedoras de la reabsorción ósea y a hormonas sistémicas (se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25(OH)2D3) (Feyen *et al.*, 1989), también trabaja de forma sinérgica con estos agentes, incrementando sus efectos sobre la reabsorción (De la Mata *et al.*, 1995). *In vivo*, los efectos de la IL-6 pueden estar regulados por los niveles circulantes del receptor soluble de IL-6 (Tamura *et al.*, 1993). Parece tener un papel importante en las primeras etapas de la osteoclastogénesis (Jilka *et al.*, 1992).

⇒ *Interleuquina 2*: se sintetiza en la médula ósea y estimula la formación osteoclástica (Girasole *et al.*, 1994).

⇒ *Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF)*: actúa en las primeras etapas del desarrollo de las células precursoras hematopoyéticas, incluyendo los osteoclastos (Kurihara *et al.*, 1990). Al contrario que M-CSF, no es primordial para la osteoclastogénesis, aunque ayuda a la diferenciación de los precursores de los osteoclastos. Se ha publicado que el GM-CSF aumenta la proliferación de células osteoblásticas *in vitro* (Dedhar *et al.*, 1988) e *in vivo* (Thacker *et al.*, 1994), probablemente mediante un mecanismo de acción indirecto. Puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (Mundy, 1993 a. Edwards *et al.*, 1998).

⇒ *Prostaglandinas*: Los estudios *in vitro* indican que, sobre todo la PGE₂, pero también las PGE₁, PGG₂ PGI₂ y PGH₂ estimulan la reabsorción ósea, gracias al incremento de la síntesis de AMP-c (Kawaguchi *et al.*, 1995). Se ha demostrado su papel en la destrucción ósea que acontece en la enfermedad periodontal midiendo, *in vivo*, los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular (Offenbacher *et al.*, 1993). Asimismo, cuando se utilizan inhibidores de las prostaglandinas (ibuprofeno o flurbiprofeno) se observa una disminución de la pérdida ósea de causa periodontal (Williams *et al.*, 1985 y 1988) o periimplantaria (Weber *et al.*, 1994. Jeffcoat *et al.*, 1995).

⇒ *TNF*: *In vitro* favorece el proceso resorptivo y parece estar implicado en la pérdida ósea que se produce en la artritis y en la enfermedad periodontal. El TNF α y la linfotoxina (TNF β) son potentes estimuladores de la reabsorción ósea (Bertolini *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1989), y parece ser que actúan del mismo modo que la IL-1. Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas ya que la indometacina inhibe parcialmente la reabsorción (Jadinski, 1988).

3.1.2.3. *El proceso biológico de la osteointegración*

El lecho labrado en el hueso para la colocación de las fijaciones de titanio no es sino una herida o solución de continuidad en el tejido óseo y su reparación es similar a la que se produce en la reparación de fracturas. Este proceso es una compleja cascada de acontecimientos, donde están implicados células, vasos y matriz ósea. Lo primero que se forma en el hueso tras sufrir el trauma es un hematoma (Bostrom *et al.*, 1995), con hematíes, plaquetas y fibrina, que favorece la llegada de linfocitos, macrófagos y células mesenquimales pluripotenciales. Para que se pueda formar a un nuevo tejido fibrovascular, sustituyendo al coágulo, se liberan localmente citoquinas, hormonas y factores de crecimiento (fundamentalmente TGF- β , BMP y PDGF) que interaccionan entre sí y que favorecen la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. En los huesos largos se forma un callo de fractura primero cartilaginoso (donde intervienen condroblastos), que luego se irá sustituyendo por hueso (acción osteoblástica); en los huesos cortos y planos, de osificación membranosa, los osteoblastos del periostio adyacente a la fractura forman directamente el callo óseo. Es fundamental la presencia de vasos en el tejido en formación que nutra adecuadamente todo el proceso, así como la síntesis de proteínas para poder formar las nuevas estructuras. En último lugar, acontecerá la mineralización de la matriz osteoide.

3.2. OSTEOPOROSIS

3.2.1. DEFINICIÓN

La osteoporosis es una enfermedad sistémica esquelética caracterizada por una masa ósea disminuida para la edad y sexo del individuo, con alteración de la microarquitectura de los huesos y con una disminución del grosor de la cortical, lo que confiere un aumento de la fragilidad ósea y una mayor facilidad para la aparición de fracturas; la osificación es normal pero hay una matriz inadecuada para osificar (Osorio y *et al.*, 2003). Microestructuralmente esto se traduce en un adelgazamiento de las laminillas óseas, tanto a nivel trabecular-epifisario (esqueleto axial), como cortical-diafisario (metáfisis del radio, cuello del fémur y húmero) (Reche y *et al.*, 2003). De esta forma se alteran las dos características principales de la resistencia ósea: la densidad y la calidad ósea (Fig. 6).

La densidad ósea se expresa en gramos de mineral por superficie o volumen y en un individuo dado, se determina por el “pico” de masa ósea y la cantidad de pérdida ósea. La calidad del hueso se refiere a la arquitectura, recambio, acumulación de daño (microfracturas) y la mineralización. La masa ósea es la cantidad total de hueso de la que dispone un individuo y alcanza su máximo entre los 30-35 años. Entre otros métodos diagnósticos, el más eficaz, a la hora de cuantificarla, es la densitometría (Miller *et al.*, 1999).

Un concepto importante es que la osteoporosis es un trastorno que produce una disminución de la densidad de matriz ósea normalmente mineralizada, y la osteomalacia es un trastorno en el que se conserva la masa total de hueso, pero con un déficit importante de su mineralización (Faibish *et al.*, 2005).



Figura. 6. Radiografía de columna vertebral osteoporótica (material de autopsia) en la que se observa una pérdida de masa ósea con preservación de las trabéculas vertebrales, nódulo de Schmorl y aplastamiento vertebral. (Cortesía Dr. F. López Barea *en* Osorio *et al.*, 2003).

El desarrollo en tamaño y fuerza óseos se produce durante la infancia, pero no se completa hasta la tercera década de la vida, después de haber terminado el crecimiento longitudinal. La masa ósea alcanzada en las primeras etapas de la vida, es quizá el mayor determinante de la salud esquelética. Los individuos con mayor “pico” de masa ósea después de este momento tienen la mayor ventaja protectora frente a las agresiones a esa densidad ósea que, inevitablemente, suponen la edad, la enfermedad y la disminución de la producción de los esteroides sexuales. Los factores genéticos juegan un papel importante en ese máximo posible de masa ósea, en el que también colaboran la nutrición, el peso corporal, la exposición a hormonas sexuales en la pubertad y la actividad física (Rizzoli y Bonjour, 2004).

3.2.2. CLASIFICACIÓN

Se han descrito varias clasificaciones de la osteoporosis atendiendo a distintos criterios.

En 1994, un Comité de Expertos de la OMS (WHO, 1994), de forma consensuada, definió la osteoporosis según criterios densitométricos, esto es, en función de la densidad de masa ósea perdida respecto a los valores medios de una población homogénea (mismo sexo, misma raza y edad comprendida entre 20-40 años). A la densidad de masa ósea de esta población se denominó “*T*”. Surgieron cuatro grupos bien definidos (Tabla VI):

Tabla VI. Clasificación de la osteoporosis (WHO, 1994)

- NORMAL: $DMO \geq 1DE$ t-score
- OSTEOPENIA: DMO entre $-1 DE$ y $-2,5$ t-score
- OSTEOPOROSIS: $DMO \leq 2,5 DE$ t-score
- OSTEOPOROSIS ESTABLECIDA: $DMO \leq 2,5 DE$ + fractura por fragilidad.

t-score = valor que compara la DMO con respecto a la media de la población adulta joven del mismo sexo ($DMO \text{ paciente} - DMO \text{ adulto joven del mismo sexo} / DE \text{ de la DMO del adulto joven del mismo sexo}$).

DE= desviación estándar de la media.

Esta clasificación permitió homogeneizar poblaciones, así como establecer un criterio diagnóstico de osteoporosis. De igual manera se inició la profilaxis con tratamientos médicos diversos para prevenir la aparición de las fracturas (Reche y *et al.*, 2003).

En la tabla VII (Tabla VII) se muestran los principales tipos de osteoporosis generalizadas o sistémicas (Romanillos y Rodríguez, 2003).

3.2.3. EPIDEMIOLOGÍA

Es difícil de establecer la prevalencia de la enfermedad y depende en gran medida del concepto de osteoporosis al que nos estemos refiriendo. Considerando de forma estricta el concepto densitométrico (osteoporosis más osteopenia), es posible que se aproxime al 80% en el caso de las mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, esta cifra es mucho menor si consideramos solamente las personas con fracturas (Reche y *et al.*, 2003).

Tabla VII. Tipos de osteoporosis (Romanillos y Rodríguez, 2003)

PRIMARIA

Osteoporosis juvenil idiopática

Osteoporosis idiopática en adultos

Osteoporosis involutiva (postmenopáusica)

SECUNDARIA

Hipercortisolismo (Sd. Cushing)

Alcoholismo crónico

Hiperparatiroidismo

Hipertiroidismo

Diabetes mellitus tipo 1

Enfermedades reumáticas (artritis reumatoide)

Inmovilización, encamamiento

Neoplasias (mieloma múltiple)

Trastornos digestivos (gastrectomía, síndromes de malabsorción...)

Aunque es cuatro veces más frecuente en las mujeres, los hombres también sufren de osteoporosis. Se estima que hay aproximadamente 400 millones de mujeres en el mundo que están incapacitadas de alguna manera a consecuencia de la osteoporosis postmenopáusica (Kong y Penninger, 2000). Existen estudios que sitúan a España en una tasa de incidencia de fracturas de cadera de 130/100.000 habitantes (Rodríguez y *et al.*, 1994).

En nuestro país, el coste del tratamiento de las fracturas de origen osteoporótico en los servicios hospitalarios supera los 800 millones de euros y menos del 35 % de los pacientes recupera una capacidad funcional similar a la previa (Sociedad Española de Geriatría y Gerodontología, 2005).

La incidencia aumenta con la edad de forma geométrica (cada década a partir de los 40 años supone un aumento del riesgo de padecer osteoporosis de 1,4-1,8 veces). Por tanto, está previsto que la incidencia de esta enfermedad se incremente en las próximas décadas a medida que la esperanza de vida aumente (epidemia silenciosa). La raza blanca y la oriental padecen más la enfermedad que la negra africana. Se sospecha que este dato está en relación con el pico de masa ósea (Reche y *et al.*, 2003).

El pico máximo de masa ósea viene determinado por factores exógenos (controlables), como son el tipo de dieta (calcio-vitamina D), el ejercicio físico, el tabaco, el alcohol, determinados fármacos, y por factores endógenos (no controlables por el momento) determinados genéticamente. Se alcanza alrededor de los 35 años y cuanto mayor sea la reserva ósea, más lenta será la pérdida de masa ósea, tanto en la mujer como en el hombre y más tarde aparecerá la enfermedad. La Tabla VIII resume los principales factores de riesgo de la osteoporosis (Reche y *et al.*, 2003).

Tabla VIII	
Factores de riesgo de la osteoporosis	
•	Edad avanzada
•	Sexo femenino
•	Historia familiar de osteoporosis
•	Menopausia precoz
•	Vida sedentaria
•	Dieta
•	Fármacos
•	Tabaco, alcohol, café
•	Bajo índice de masa corporal

La osteoporosis idiopática es, con mucho, la más frecuente de todas. La causa habitual de la **osteoporosis tipo I** es la menopausia (aunque no es la única, puesto que también afecta a varones) y la edad de presentación son los 65-70 años, con una proporción de mujer a hombre de 6:1. Las fracturas del extremo distal del radio afectan típicamente a mujeres entre los 65 y los 70 años. Constituyen un marcador de osteoporosis y de riesgo de fractura de cadera (importante desde el punto de vista de profilaxis médica).

En la osteoporosis tipo II, involutiva o senil, las fracturas de cadera y del extremo proximal de húmero son el indicador epidemiológico más fiable de la prevalencia de osteoporosis, puesto que, habitualmente requieren hospitalización.

3.2.4. ETIOPATOGENIA

Como parte del proceso natural de la edad, los huesos comienzan a descomponerse más rápido de lo que las células pueden formar nuevo tejido óseo. En las mujeres, la pérdida ósea se acelera tras la menopausia cuando los ovarios cesan de producir estrógenos, una de las hormonas que protege frente a esta pérdida.

Dentro del proceso de pérdida ósea existen dos mecanismos primarios:

- Pérdida rápida: asociada a destrucción osteoclástica, presentando perforaciones de las trabéculas.
- Pérdida lenta o crónica.

A nivel celular y tisular, existen dos mecanismos de pérdida ósea en la osteoporosis. (Compston 1999) (Fig. 7). Cuantitativamente, lo más importante es un aumento en la frecuencia de activación (también conocida como *turnover* óseo elevado) en el que aparecen mayor número de *BMUs* activadas sobre la superficie ósea; esto significa que en cualquier momento hay mayor número de unidades llevando a cabo reabsorción ósea, que es potencialmente reversible siempre y cuando vaya emparejado con el remodelado óseo y ese balance se mantenga. El segundo mecanismo, que normalmente coexiste con el *turnover* óseo elevado, es el del remodelado desequilibrado, o de balance negativo, en el que la cantidad de hueso formada por las unidades remodeladoras individuales es menor que la reabsorbida, debido tanto a un aumento en la reabsorción como a una disminución en la formación ósea, o a una combinación de ambos procesos. Este tipo de pérdida ósea es irreversible una vez que el ciclo de remodelado se ha completado, al menos en lo que a esa unidad remodeladora se refiere.

Las alteraciones en el remodelado responsable de la pérdida de hueso se acompañan de cambios en la arquitectura ósea, que es un factor muy importante en la resistencia mecánica del hueso (Compston *et al.*, 1990). En el hueso esponjoso se puede producir tanto un adelgazamiento de las trabéculas óseas, como la perforación y/o erosión de las mismas. En cierto modo, estas dos situaciones dependen una de la otra. Cuando se da adelgazamiento trabecular, la arquitectura ósea está mejor conservada que cuando aparecen perforaciones y/o erosiones, presentando estos últimos procesos los efectos más adversos

sobre la resistencia ósea. Un aumento en la frecuencia de activación y/o en la profundidad de reabsorción predisponen a la aparición de perforaciones y erosiones, mientras que los estados de bajo *turnover* óseo favorecen el adelgazamiento trabecular.

Parece ser que la expresión del OPG (factor inhibidor de la osteoclastogénesis) está inducida por los estrógenos (17- β –estradiol) (Hofbauer et al., 1999; Kong y Penninger, 2000), lo que aporta una posible explicación a la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Por eso, el declive de las hormonas sexuales en la menopausia altera los reguladores naturales de la masa ósea y lo que se produce es la pérdida de tejido óseo, con todas las consecuencias que este hecho conlleva, como fragilidad ósea, artritis o fracturas de cadera. A nivel molecular, la disminución de la función ovárica lleva a la caída de los niveles de estrógenos y por tanto, al descenso de los niveles de OPG. En un estudio llevado a cabo en ratas ovariectomizadas se vio que la inyección de OPG bloqueaba la pérdida ósea y la osteoporosis que normalmente aparece asociada a la pérdida de función ovárica (Simonet et al., 1997).

3.2.5. CLÍNICA

El fenómeno clínico fundamental en la osteoporosis es la fractura, que se caracteriza por tener una estrecha relación con la edad, afectar sobre todo a las mujeres postmenopáusicas, ser precedidas por traumatismos de baja energía y producirse en huesos debilitados, patológicos y con baja densidad de masa ósea.

En la osteoporosis tipo I la manifestación clínica típica es el aplastamiento vertebral. La fractura suele ser secundaria a una caída y cursa con dolor a punta de dedo sobre la línea media dorsal e irradiación metamérica según la altura. Existe contractura de la musculatura paravertebral y a veces se puede sumar al cuadro de dolor un íleo paralítico por mecanismo reflejo.

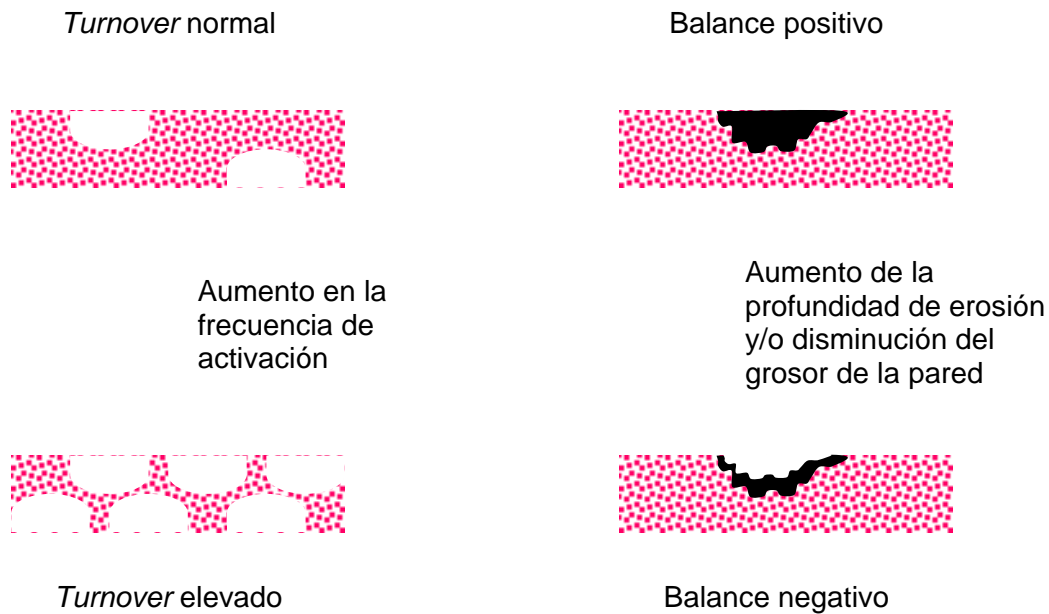


Figura 7: Mecanismo de la pérdida ósea en la osteoporosis (Modificado de Compston JE, 2001)

Las fracturas del extremo distal del radio van precedidas de una caída sobre el talón de la mano, posterior dolor, deformidad en “dorso de tenedor”, tumefacción e impotencia funcional.

En la osteoporosis tipo II, involutiva o senil, son típicas las fracturas de cadera y del extremo proximal del húmero. La fractura de cadera se caracteriza por dolor, en muchas ocasiones irradiado a la rodilla, claudicación en la marcha, acortamiento y rotación externa del miembro afecto. Las fracturas subcapitales de húmero, que se producen tras sufrir una caída con traumatismo indirecto sobre el brazo, cursan con dolor, deformidad, tumefacción e impotencia funcional.

3.2.6. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de esta enfermedad son necesarias técnicas que de una manera directa o indirecta valoren las características óseas. A lo largo de la historia se han utilizado diversas técnicas de imagen, desde isótopos pasando por RX, ultrasonidos, TAC e incluso estudios anatomopatológicos, con la finalidad de obtener una medición más precisa de la densidad y la arquitectura óseas, que ayuden a identificar a aquellos grupos con mayor riesgo de fractura (tabla IX) (Cobo y *et al.*, 2003).

Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, la forma de diagnosticar la osteoporosis es clínica, cuando el enfermo va a urgencias tras sufrir un traumatismo casual y es diagnosticado de fractura. Otras veces se diagnostica en la consulta por el aumento de la cifosis dorsal y disminución de la talla.

3.2.6.1. *Medición de la densidad mineral ósea*

A. El estudio **radiológico convencional**, en ausencia de fractura, es poco útil para apreciar cambios de la densidad ósea precoces. De hecho, hace falta una pérdida de al menos un 30% para que sea apreciable. Sin embargo, cuando se ha producido la fractura, es extremadamente útil. Además, se utiliza para el diagnóstico diferencial de las fracturas patológicas, para descartar la posibilidad de que se trate de un tumor óseo o secundario a metástasis (Cobo y *et al.*, 2003).

B. En la actualidad, los criterios diagnósticos de la osteoporosis se basan en la densitometría radiológica de doble energía axial **DXA, QDR o DEXA** (es la que se suele utilizar en el Sistema Nacional de Salud) en lumbar y femoral. Como ya se ha comentado anteriormente, la OMS estableció por consenso los criterios diagnósticos de la enfermedad teniendo en cuenta preferiblemente la DEXA, evaluando la DMO o el CMO en lumbar, femoral y radio de la mujer (Tabla VI) (Cobo y *et al.*, 2003).

Tabla IX

Técnicas para la valoración de la osteoporosis (Cobo y *et al*, 2003)

1. Técnicas de medición de la densidad mineral ósea.

a. Técnicas radiográficas

i. Absorciometría radiológica/ fotodensitometría (RA)

ii. Radiogrametría

b. Densitometría de energía simple

i. Absorciometría fotónica simple (SPA)

ii. Absorciometría por rayos X de energía simple (SXA)

c. Densitometría de doble energía

i. Absorciometría fotónica dual (DPA)

ii. Densitometría radiológica de doble energía (DXA, DEXA, QDR)

d. Tomografía computarizada cuantitativa (QTC)

e. Ultrasonido cuantitativo (QUS)

2. Técnicas de medición de la microestructura

a. Histomorfometría

b. MicroTAC

El principio de esta técnica es generar una imagen digitalizada en función de la atenuación de dos haces colimados de rayos X de alta y baja energía (140 y 70 Kv) de un determinado sector anatómico. El cálculo de la densidad se realiza a través de un proceso matemático, que se inicia con la diferenciación del área explorada (cm^2), la determinación del contenido mineral (g) y el cociente de ambos, que origina la densidad por unidad de superficie (g/cm^2) referida al área de proyección (Cobo y *et al.*, 2003).

Fundamentalmente evalúa columna lumbar (hueso trabecular) en proyección antero-posterior y cuello de fémur (hueso cortical); no obstante, existen programas específicos para la exploración lateral de columna lumbar, antebrazo, calcáneo y cuerpo entero, en este último caso aportando, además, información sobre la composición corporal de los tejidos blandos. También se puede evaluar la morfometría vertebral a través de un barrido lateral rápido, ofreciendo una imagen completa de la columna toracolumbar, capaz de identificar fracturas o deformidades vertebrales. El tiempo de exploración es de 6-15 minutos manteniendo dosis de radiación muy bajas de 0,5 a 2,4 mSv (esta última para cuerpo entero) (Cobo y *et al.*, 2003).

La precisión determinada por el coeficiente de variabilidad (CV) es de alrededor del 1-2%, según los sectores anatómicos. El error de exactitud es del 5-10%, la fiabilidad de 94-96% y reproducibilidad del 98-99%. Existen factores que artefactan la determinación de la DMO en columna lumbar; algunos de ellos son corregibles, como los contrastes radiológicos, clips, botones metálicos tejidos sintéticos, etc. Otros son factores intrínsecos, sobre todo relacionados con la edad (más de 65 años) que pueden elevar falsamente los niveles de DMO, como la artrosis, calcificaciones de tejidos blandos, fracturas vertebrales, alteraciones de la estática de la columna, etc. Además, las mediciones incluyen una

cantidad sustancial de hueso compacto al capturar no sólo cuerpo vertebral sino también arcos y apófisis espinosas (Cobo y *et al.*, 2003).

Frente a estas circunstancias intrínsecas se pensó hace algunos años en la DXA lateral de columna lumbar como alternativa, que hace posible una evaluación casi exclusiva de hueso trabecular, evitando las estructuras posteriores. Sin embargo también es frecuente la artefactación por superposición de las costillas o la pala iliaca. La reproducibilidad baja, dado el gran espesor y la poca uniformidad de los tejidos blandos en esta proyección y también la baja precisión de esta técnica (CV 3-4 %) han hecho que prácticamente no se utilice (Cobo y *et al.*, 2003).

Respecto a la cadera, la mayor precisión con menor probabilidad de artefactación se produce cuando se evalúa el total de la región proximal del fémur con CV 1%; por ello se tiende a utilizar como estándar para el diagnóstico. Se pueden evaluar parámetros geométricos que influyen de forma independiente en el riesgo de padecer fractura de cadera, como son la longitud del eje del cuello del fémur (que ha obtenido resultados controvertidos), la anchura media del cuello femoral o el ángulo de inserción del cuello del fémur, que han demostrado en estudios de casos y controles de la población española, ser factores de riesgo independiente, tanto de la edad, como de la masa ósea respecto a la fractura femoral, tanto en la población masculina, como femenina (Cobo y *et al.*, 2003).

En nuestro país los aparatos más utilizados son los de las marcas Lunar®, Hologic® y Norland® que suministran cifras de DMO en g/cm^2 , en t-score (comparando con población joven del mismo sexo) en z-score (comparando con población de misma edad y sexo). Dado que las cifras g/cm^2 difieren de un modelo a otro, se aconseja registrar los valores en t-score y z-score que los hacen más útiles en clínica. La densitometría

DEXA de huesos periféricos nos puede ayudar en el cribado, pero es mejor utilizar la medición lumbar y femoral. (Fig. 8)

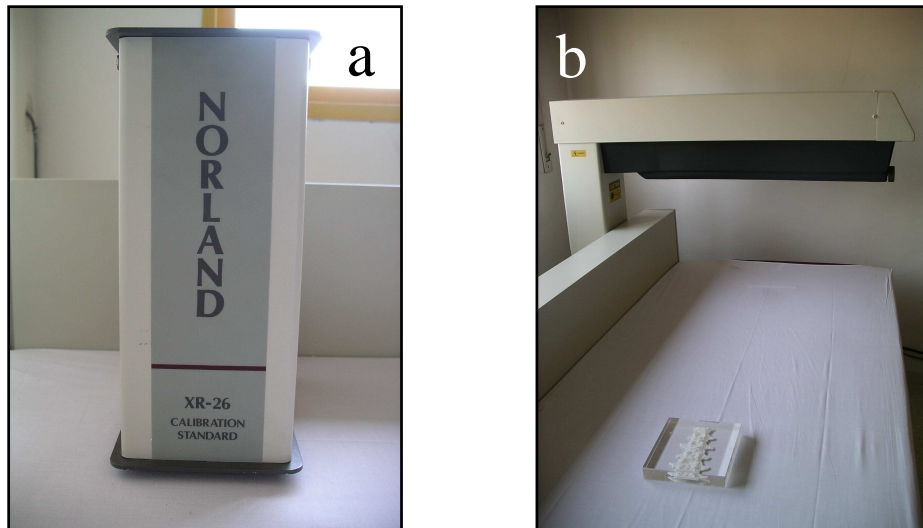


Figura 8. Densitómetro Norland®: (a) Detalle del modelo, (b) Fantomas de columna para calibrar el aparato.

Se han desarrollado equipos de densitometría periférica capaces de determinar la DMO en el extremo ultradistal del radio, diáfisis radiocubital y calcáneo, que tienen la misma precisión y baja exposición radiológica que la DXA axial, aunque poseen limitaciones, como las posibles alteraciones regionales y la escasa respuesta a tratamientos que han demostrados cambios significativos en la DMO axial. Dado que existe una estrecha correlación entre las mediciones de antebrazo de DXA y SXA, seguramente también tengan capacidad para predecir el riesgo de fractura. Es una técnica capaz de predecir este riesgo, muestra de modo preciso la masa ósea, permite el consejo de tratamiento preventivo y ve la respuesta al tratamiento. La mejor capacidad predictiva se produce cuando la evaluación de la masa ósea se realiza en el sector donde se evalúa el riesgo de fractura (Cobo y *et al.*, 2003).

C. La tomografía axial computarizada (TAC) cuantitativa (**QCT**) es la única técnica no invasiva que mide en tres dimensiones la verdadera densidad volumétrica (mg/cm^3) de hueso trabecular o cortical en cualquier localización del esqueleto. Valora el hueso central del cuerpo vertebral, que es el más sensible para detectar los cambios en el contenido mineral óseo. Usada con una ventana vertebral es, entre todos los métodos disponibles en la actualidad, el más sensible para determinar cambios en la masa ósea, pero es poco específica, cara e invasiva (la radiación emitida es mayor que con la radiografía convencional o con la DEXA, 1-10 mSv) (Cobo y *et al.*, 2003).

D. El **ultrasonido** se perfila como una técnica útil (cribaje) para predecir el riesgo de fractura, con las ventajas de ser poco invasivo, barato y poderse realizar de manera ambulatoria. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta prueba tienen baja reproducibilidad, con sólo un 70% de correspondencia con los resultados de la DEXA. Es una técnica novedosa, que no mide masa ósea y que ha sido aprobada por la FDA para la valoración de la osteoporosis (Cobo y *et al.*, 2003).

Evalúa dos factores fundamentales: la atenuación del sonido y la velocidad del sonido. La atenuación o BUA, mide la absorción de la energía del sonido a través del hueso en decibelios por megaherzio. Su información aporta datos sobre la densidad ósea y la cantidad, estructura y orientación de las trabéculas. La velocidad del sonido (VOS o SOS) mide la velocidad con que atraviesa la onda de sonido el hueso en metros partido por segundo. Es el principal parámetro que se correlaciona con las mediciones de masa ósea obtenidas por DEXA. Si la estructura ósea es normal, la atenuación será elevada, pero si el hueso es osteoporótico, la atenuación será baja. De igual forma, si el hueso es compacto, la onda lo atravesará más rápido que si el hueso es osteoporótico, ya que la onda de sonido se transmite mejor en medio sólido que por aire. El *stiffnes* o combinación matemática del

BUA y el VOS, se expresa también en valores t-score y z-score. Resumiendo, un hueso osteoporótico tendrá un BUA, VOS y *stiffnes* bajos, es decir, una t-score y z-score más negativas, al igual que sucede con la densitometría DEXA. Habitualmente se realiza en el hueso calcáneo, ya que su composición es mayoritariamente hueso trabecular (Cobo y *et al.*, 2003).

En un estudio llevado a cabo en el Centro de Salud de Atención Primaria Salvador Allende de Valencia en 115 mujeres postmenopáusicas a las que se les realizó una ultrasonografía ósea de calcáneo, se vio que el 50,4 % presentaban osteoporosis y un 29,6%, osteopenia. Por tanto, el 80 % de las mujeres del estudio tenían alteración de la densidad mineral ósea. Los autores concluyeron que esta técnica podría ser una herramienta útil en atención primaria para el cribado de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas, aunque presenta una serie de limitaciones, como la uniformidad de criterios para el diagnóstico de la enfermedad en estos dispositivos y que no debe ser utilizado para controlar la respuesta al tratamiento, puesto que el esqueleto periférico responde con pequeños incrementos de densidad ósea que coinciden con el error de precisión de los equipos (Reyes Balaguer y Moreno Olmos, 2005).

Los US de calcáneo han demostrado una predicción de fractura igual a la densitometría DEXA, es decir de un 60-70% (Orozco P, 2001), pero los estudios se han realizado comparándola con la DEXA en poblaciones de edad avanzada fracturada y no fracturada. El principal problema está en que todavía no se conoce bien cuál es el punto de corte para evaluar el riesgo de fractura en población no fracturada y más joven.

E. En la osteoporosis el estudio de la **calcemia, calciuria y fosfatemia** es normal. Los niveles de vitamina D pueden ser normales o discretamente elevados. Los parámetros bioquímicos que indican formación ósea son la osteocalcina y la fosfatasa alcalina, y se

miden en suero. Los marcadores de resorción ósea son la hidroxiprolina y las piridinolinas urinarias. La determinación de rutina de todos estos parámetros no está justificada, ya que no predicen el riesgo de fractura ni ayudan a determinar la densidad de masa ósea (Cobo y *et al.*, 2003).

3.2.6.2. Medición de la microestructura

La arquitectura trabecular ósea se ha mostrado como el determinante mayor e independiente de predicción de fractura vertebral en varones con osteoporosis. Se piensa pues, que la microarquitectura ósea juega un papel importante en la resistencia del hueso y sería de gran ayuda para el manejo de la osteoporosis, así como el desarrollo de métodos que valoren esta microestructura y sus alteraciones. La combinación entre el volumen óseo y las variables arquitecturales explican más del 90% de la resistencia ósea (Cobo y *et al.*, 2003).

A. Histomorfometría

Actualmente el método más desarrollado es la histomorfometría, pues permite valorar parámetros que reflejan la estructura y el recambio óseos, a niveles intermedios de organización, en el tejido o la unidad multicelular básica. Se realiza sobre una muestra de biopsia, fijada y cortada en láminas de 5 a 20 μm de espesor; posteriormente se procede a la medición de distintos parámetros histomorfométricos, bien de forma manual, semiautomática o automática. Para medir de manera dinámica el recambio óseo se pueden administrar unos días antes de la toma de la biopsia dos ciclos cortos de 2 y 4 días de tetraciclina oral (10 mg/kg de peso/ día). La sustancia queda depositada a lo largo del frente de calcificación en dos líneas distintas, de esta forma podremos valorar la velocidad de osificación. Los parámetros histomorfométricos se dividen en varios tipos (Cobo y *et al.*, 2003):

A₁. Parámetros de estructura ósea

- Volumen de hueso trabecular: es el porcentaje de tejido óseo esponjoso, incluyendo hueso mineralizado y osteoide.
- Volumen óseo total: es una valoración de masa ósea y puede ser comparada con la medición de la densidad mineral ósea por métodos no invasivos.
- Anchura cortical: es la media del grosor de las corticales.
- Grosor de la pared: representa la cantidad de hueso formado en cualquier unidad de organización ósea intermedia y es la anchura de una trabécula ósea completa.
- Grosor trabecular: separación trabecular y número de trabéculas.
- Estudio de la conectividad trabecular: consiste en contar el número de nodos y terminaciones, valorando la distancia entre nodos, terminaciones y entre nodos y terminaciones. El cociente entre el número de nodos y el número de terminaciones es un índice de la conectividad espacial.
- Volumen estrella: representa una estimación tridimensional del tamaño medio del espacio medular.
- Número Euler: basado en el número de poros y componentes estructurales que están unidos; es una medida directa de conectividad.
- Geometría fractal: describe la complejidad de la estructura, de acuerdo con su disposición espacial.

A₂. Parámetros de formación ósea

- Volumen osteoide: representa la fracción de hueso trabecular que no está calcificada.
- Superficie osteoide: es el porcentaje del total de superficie trabecular ocupado por osteoide.
- Grosor osteoide: la diferencia de la anchura de la unión osteoide.

- Grado de aposición mineral: distancia entre los puntos medios de dos tinciones de tetraciclina; es el grado de progresión del frente de mineralización.
- Superficie de mineralización: extensión de la superficie marcada por tetraciclina expresada sobre la superficie total del hueso.
- Grado de formación ósea: es la suma de mineralización ósea por unidad de superficie trabecular y por día.
- Aposición ajustada: cantidad de hueso mineralizado por día y por unidad cubierta de osteoide.
- Período de formación: tiempo necesario para reconstruir una nueva unidad estructural ósea.
- Tiempo de retraso de mineralización: intervalo entre el depósito de osteoide y su posterior mineralización.

A3. Parámetros de resorción ósea

- Superficie erosionada: es el porcentaje de superficie ósea erosionada que comprende, tanto los sitios de resorción activa, donde hay osteoclastos, como los sitios donde ésta ha cesado pero los osteoblastos no han llegado todavía a rellenar las lagunas de Howship.
- Profundidad de la erosión: número de erosiones lacunares en cada cavidad de resorción por el grosor laminar.

A4. Frecuencia de activación

Es la probabilidad de que un nuevo ciclo de remodelado pueda estar iniciándose en algún punto de la superficie ósea; es el grado de formación por la anchura de la pared y día.

Los índices de mayor poder estadístico son el grosor trabecular, el grado de aposición, el espesor de la pared y la profundidad y número de las erosiones. Según la

heterogeneidad histológica del recambio en la osteoporosis, se pueden dividir éstas en: de recambio alto, bajo o normal, ayudándonos a seleccionar el tratamiento más adecuado. La variabilidad inter e intraobservador de esta técnica es pequeña para todos los parámetros, excepto para la anchura cortical, pues es difícil identificar el límite entre cortical y hueso trabecular.

Hay una gran correlación entre las técnicas manuales y las computarizadas, y la variación entre muestras depende del sitio de la biopsia. La histomorfometría se ha usado para valorar los efectos sobre el remodelado y la calidad óseos en estudios experimentales, así como para valorar los mecanismos de acción, de seguridad y los efectos a largo plazo de algunos tratamientos. Pero en la clínica diaria, las indicaciones de la histomorfometría sólo se darían en pacientes que por historia, signos, radiología o perfil bioquímico, sugieren la posibilidad de osteomalacia, mastocitosis, mieloma no secretor, sarcoidosis, etc., así como en casos graves de osteoporosis no respondedoras a tratamientos habituales.

B. MicroTAC

La microTAC es otro método de valoración de la estructura ósea, que permite realizar reconstrucciones tridimensionales con resoluciones espaciales de hasta 2 μm . Esta técnica se ha utilizado en material de biopsia de numerosos estudios, donde ha mostrado un gran poder de predicción de fracturas en relación con la fragilidad esquelética y la resistencia ósea, medidas por diferentes técnicas de biomecánica. La TAC de alta resolución también se puede usar para valorar la arquitectura del hueso trabecular *in vivo*, con una resolución espacial de 150 μm , aunque no es lo suficientemente fina para permitir una adecuada medición del grosor trabecular (Cobo y *et al.*, 2003).

3.2.7. TRATAMIENTO

Para escoger el fármaco más adecuado se debe etiquetar correctamente al paciente. Si es una osteoporosis secundaria a otra patología, deberemos tratar también esa patología e intentar compensarla o curarla y en determinadas ocasiones, deberemos añadir el tratamiento de la osteoporosis para evitar que pierda más masa ósea. En la actualidad los fármacos comercializados son antiresortivos, es decir lo que hacen es frenar la pérdida ósea y aumentar ligeramente la masa ósea.

En la tabla X (Orozco, 2001) se especifican los datos más relevantes de los fármacos disponibles en nuestro país para el tratamiento de la osteoporosis y su nivel de evidencia antifractura. No están incluidos los que todavía no han demostrado reducción de riesgo de fractura en ensayo clínico aleatorizado como por ejemplo el flúor, la ipriflavona, la testosterona o la tibolona por no considerarse en este momento opciones terapéuticas válidas para el tratamiento de la osteoporosis fuera del contexto de un ensayo clínico.

3.3.7.1. *Revisión por grupos terapéuticos de los principales fármacos utilizados en la osteoporosis*

Los datos sobre eficacia, posología, contraindicaciones, efectos secundarios, controles y nivel de evidencia de fractura, así como su efecto sobre la DMO, se encuentran en las tablas XI y XII, respectivamente (Tablas X y XI).

A. Bifosfonatos

Son compuestos sintéticos análogos al pirofosfato, potentes inhibidores de la resorción ósea. Existen dos grupos farmacológicos: los nitrogenados (alendronato y risendronato) y los pirofostatos (etridonato) con diferentes vías metabólicas de actuación que todavía están en estudio.

Recientemente han aparecido estudios sobre los efectos a nivel cardiovascular de los bifosfonatos. En este sentido el etidronato ha demostrado disminución del grosor de la íntima de la carótida en pacientes diabéticos con osteopenia (Koshiyama *et al.*, 2000) y los bifosfonatos nitrogenados (alendronato) inhiben la formación de la GGPP en la vía del mevalonato de la síntesis de colesterol (Bergstrom *et al.*, 2000).

De forma alarmante, han proliferado los trabajos que relacionan la terapia con bifosfonatos y la aparición de osteonecrosis mandibular, por lo que su utilización en el tratamiento de la osteoporosis está cada vez más en entredicho. (Marx *et al.*, 2005; Zarychanski *et al.*, 2006).

B. Calcitonina (CT)

Es una hormona polipeptídica que inhibe la actividad resorptiva de los osteoclastos. Hoy está prácticamente en desuso.

C. SERMS

Son moduladores selectivos de los receptores estrogénicos; dentro de este grupo está incluido el tamoxifeno (sin indicación autorizada en osteoporosis ya que parece aumentar el cáncer de útero) y el raloxifeno. Están en desuso.

D. Terapia hormonal sustitutiva con estrógenos (THS)

Los estrógenos inhiben la resorción y el *turnover* óseo con independencia de la vía utilizada, pero sus efectos sólo persisten mientras dura el tratamiento (5 años después de dejar la terapia la DMO es similar a la de una persona que nunca haya seguido el tratamiento). Además, en edades superiores a 70 años, la THS no frena la pérdida de la DMO (Santoro *et al.*, 1999). A nivel cardiovascular la terapia mejora el perfil lipídico, la agregación plaquetaria y la fibrinólisis, aunque el efecto varía según el riesgo cardiovascular basal de la paciente (Orozco 2001; Johnston *et al.*, 2000). Los datos de los

ensayos clínicos no confirman el efecto beneficioso sobre el riesgo cardiovascular visto en los estudios observacionales.

E. Calcio

El calcio es un inhibidor del remodelado óseo dependiente de la PTH. Se recomienda una ingesta diaria mínima de calcio de 1000 mg/día y de 1200-1500 mg/día durante el embarazo, la lactancia y la postmenopausia. Los suplementos de calcio (500-1000 mg diarios) tienen un modesto efecto antirresortivo, se ha demostrado que por sí solos, son eficaces para mantener o aumentar la DMO (Panel de expertos de la Sociedad Española de Reumatología, 2003, Orozco 2001).

F. Vitamina D

En el hueso actúa sobre los osteoblastos regulando su mineralización y disminuye la síntesis y la secreción de la PTH. Su déficit produce un aumento de la PTH que producirá un incremento de la resorción del hueso, sobre todo cortical.

Se presenta en forma de vitamina D no activa (calciferol) y activa (calcitriol) y existen combinados de calcio + vitamina D3. Parece ser que el efecto de la vitamina D estándar sobre la densidad ósea es significativamente menor que el de la vitamina D hidroxilada (Cranney *et al.*, 2001).

Tabla X: Resumen de los fármacos utilizados en el tratamiento de la osteoporosis (Orozco, 2001)

FÁRMACO	DOSIS	CONTRA-INDICACIÓN	EFFECTOS SECUNDARIOS	CONTROLES DE TRATAMIENTO	NIVEL EVIDENCIA ANTIFRACTURA
Alendronato	1 comp. De 10 mg/día ó 1 comp. de 70 mg/ semana, tras 2 horas de ayuno, con un vaso lleno de agua corriente y sin reclinarse ni tomar nada durante 30 minutos, para disminuir el riesgo de esofagitis	Problemas esofágicos (ej: acalasia, esofagitis) Hipocalcemia. Insuficiencia renal grave.	Esofagitis y otros trastornos gástricos	Ninguno	Vértebra: A Cadera: A
Etidronato	2 comp. / día durante 14 días cada 3 meses, tras 2 horas de ayuno, con un vaso lleno de agua corriente y sin tomar nada durante 2 horas	Fractura reciente hipocalcemia, Insuficiencia renal grave	Bien tolerado. Nauseas, dispepsia	Ninguno	Vértebra: A Cadera: B
Risedronato	1 comp. de 5 mg/ día, tras 2 horas de ayuno, con un vaso lleno de agua corriente y sin reclinarse ni tomar nada durante 30 minutos	Hipocalcemia, insuficiencia renal grave	Ninguno (falta confirmación en experiencia clínica)	Ninguno	Vértebra: A Cadera: A
Calcitonina	Inhalación nasal de 200 UI / día de CT salmón. No está bien establecida cuál es la dosis eficaz de elcatonina (40 ó 80 UI)	Alergia a las proteínas de pescado	Nasal: rinitis. Inyec.: inflamación local y sofocos	Ninguno	Vértebra: A Cadera: B
Raloxifeno	1 comp. / día con o sin comida. Interacciona con Sintrom® y colestiramina	Sofocaciones, antecedente de tromboembolismo y trombosis venosa, insuficiencia renal o hepática grave, cáncer activo de endometrio o mama (en revisión) hombres y premenopáusicas (en estudio), embarazo	Sofocaciones, tromboembolismo y trombosis venosa, calambres en piernas	Ninguno	Vértebra: A
THS	Variables según mujer: parches de 50 a 100 µg con o sin geatágeno 1 comp. de estrógeno equino conjugado / día	Cáncer mama, endometrio o útero, Antecedente de tromboembolismo y trombosis venosa o pulmonar, hepatopatía severa, Embarazado, hemorragia vaginal	Aumento de riesgo tromboembolismo venoso y cáncer de mama, sangrado vaginal en pauta discontinua, reacción local en parches, mastalgia, cefalea, NO aumenta riesgo cáncer endometrio si se utilizan conjuntamente con progestágenos	Revisión ginecológica, mamografía. Analítica básica	Vértebra: B Cadera: A (si inicio < 60 años)
Vitamina D	Varía según el déficit del paciente y el tipo de vit D: Ej: 800-1000 UI -Colecalciferol o vit D3 -Calciferol ó 25 (OH) D3 Cualquier dosis monitorizada de clacitriol o 1,25 (OH) D3	Hipovitaminosis D, hipercalcemia, osteodistrofia renal con hiperfosfatemia	Ninguna a dosis terapéuticas	Ninguno si se utilizan dosis de hasta 1000 UI/día de 25(OH)D3. Si se utilizan dosis mayores o calcitriol vigilar Ca, P, fosfatasas alcalinas, y calciuria. Si se corrige un hiperparatiroidismo secundario vigilar 25(OH)D3 y PTH	Cadera:A(si déficit)
Calcio	Varía según el déficit de la ingesta del paciente	Hipercalcemia, hipercalciuria (discutible)	Raros a dosis de 1-1,5 g/día	Ninguno excepto si se administra conjuntamente con fármacos que aumentan la absorción de calcio (calcemia, calciuria)	C

Nivel evidencia: A: ensayo clínico randomizado, *B:* ensayo clínico no randomizado o estudios observacionales bien diseñados, *C:* comité de expertos, resultados contradictorios ensayos clínicos.

G. Fármacos anabólicos

Aunque la prescripción antirresortiva es el primer escalón de tratamiento en la osteoporosis, los nuevos agentes osteoformadores o anabólicos representan un importante avance para la terapia de los casos más complejos y graves. Dentro de este grupo, los más esperanzadores son el ranelato de estroncio y la PTH (Fernández-García *et al.*, 2005).

El **fluoruro sódico** estimula directamente la función osteoblástica sin efecto sobre los osteoclastos, pero no ha demostrado reducir la tasa de fracturas y tiene efectos secundarios que limitan su utilización en clínica (Haguenauer *et al.*, 2000; Sowers *et al.*, 2005).

Hormona del crecimiento / IGF-I. La mayor parte de los trabajos realizados con GH han observado cambios mínimos sobre la masa ósea, si bien se trataba de estudios de corta duración (< 1 año). Estos resultados parecen ser la consecuencia de que se activara también la resorción ósea mediada por osteoclastos. Por otro lado, el tratamiento continuado con GH se ve limitado por su elevado coste y los posibles efectos adversos (diabetes mellitus y síndrome del túnel carpiano). Sumando todos estos factores, no parece aconsejable la terapia con GH, sin embargo, en estudios a largo plazo (3-4 años), sí se evidencian beneficios óseos (elevación de la DMO) por lo que su utilización sí tendría una razón de ser, si bien son necesarias futuras investigaciones para dilucidar estas dudas (Fernández-García *et al.*, 2005).

En cuanto al IGF-I, parece que su administración aumenta los niveles séricos de los marcadores bioquímicos de la formación ósea, no alterando prácticamente nada los de la resorción. El problema de la administración crónica de esta hormona son sus efectos nocivos sobre otros tejidos debido a su capacidad proliferativa. Son necesarios más

estudios que se centren en la obtención de análogos de estas sustancias, que eviten además la activación de todo el sistema de remodelado óseo (Fernández-García *et al.*, 2005).

Las **estatinas** elevan los niveles plasmáticos de osteocalcina y disminuyen los marcadores bioquímicos de la resorción ósea, pero actualmente el potencial terapéutico de las estatinas en la osteoporosis es incierto (Fernández-García *et al.*, 2005).

El **estroncio** estimula la proliferación de los osteoblastos e inhibe la formación de los osteoclastos y aunque la mayoría de los trabajos muestran resultados prometedores sobre la reducción del riesgo de fracturas vertebrales, es necesario profundizar sobre los mecanismos de acción de sus efectos biológicos (Fernández-García *et al.*, 2005).

La **hormona paratiroidea (PTH)** tiene un potente efecto anabólico sobre el hueso, aumentando la formación ósea. Ha demostrado reducción del riesgo de fracturas tanto vertebrales como no vertebrales. Si se administra la hormona de forma intermitente, a dosis bajas, se produce un aumento de la masa ósea, produciéndose una estimulación de los factores de crecimiento y disminuyendo la apoptosis osteoblástica. Esta situación dual se conoce como efecto paradójico, pero tiene efectos secundarios que limitan su utilización (Fernández-García *et al.*, 2005).

H. Otros fármacos (Orozco 2001)

La **ipriflavona** es un derivado sintético de la isoflavona. Los datos sobre la prevención de la pérdida ósea postmenopáusica son contradictorios (Agnusdei *et al.*, 1997; Alexandersen *et al.*, 2001; Arjmandi *et al.*, 2000; Minegishi *et al.*, 2002; Deyhim *et al.*, 2005).

El consumo de **soja** se ha asociado a una mayor DMO en población menopáusica japonesa (Horiuchi *et al.*, 2000) y al mantenimiento del CMO al administrarla junto con

isoflavona (Chen *et al.*, 2003), aunque parece no tener efectos significativos en las mujeres jóvenes (Anderson *et al.*, 2002), ni en la menopausia precoz (Gallagher *et al.*, 2004).

Las **tiazidas** actúan aumentando la reabsorción del calcio en la orina. Los datos tras los ensayos clínicos son contradictorios (La Croix *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2000).

La **tibolona** es un esteroide sintético con actividad estrogénica, progestágena y androgénica utilizado como alternativa a la THS que ha demostrado reducción de la pérdida de la DMO lumbar y femoral similar ésta. En 2001, comenzó el LIFT (estudio a largo plazo sobre el efecto de la tibolona en las fracturas), que ayudará a entender las diferencias y similitudes entre los estrógenos y la tibolona; los últimos datos indican su beneficio en la reducción del riesgo de fractura vertebral (Cummings, 2006; Grobbee DE, 2005; Devogelaer 2004).

En el trabajo llevado a cabo por Cranney *et al.* (2001) donde se resumen los meta-análisis de distintos tratamientos de la osteoporosis postmenopáusica, se observa que los mejores resultados en cuanto a DMO total se consiguen con los tratamientos con alendronato y con calcio ($p < 0,01$), pero no en partes del cuerpo en concreto. En cuanto a las dosis, se vio que mayores cantidades de risendronato, alendronato y THS, conseguían mayores densidades, pero no ocurría lo mismo con dosis crecientes de calcio o de calcitonina. Asimismo, a mayor duración del tratamiento con risendronato, alendronato, raloxifeno y THS, mejores resultados en el tiempo en la densidad de la espina lumbar. No se encontraron diferencias significativas con la vitamina D, la calcitonina o el calcio.

Al añadir mayores cantidades de calcio a los tratamiento con vitamina D o alendronato se observan mejores resultados en las DMOs lumbar y total (Cranney *et al.*, 2001).

Los tratamientos con vitamina D hidroxilada, calcitonina, raloxifeno y los bifosfonatos reducen la tasa de fracturas vertebrales. Los resultados con THS son algo contradictorios. En cuanto a las fracturas no vertebrales, sólo el risendronato y el alendronato ofrecen resultados realmente prometedores.

En general, la elección del tratamiento correcto se tiene que basar en varios factores, teniendo en cuenta las características individuales de cada paciente.

Tabla XI . Efectos sobre la DMO en cadera, antebrazo, y cuerpo completo (Cranney <i>et al.</i> , 2002)					
Zona	Intervención (años)	No. de estudios/ pacientes	Diferencia de la media ponderada * (95% CI)	Valor P	Heterogenicidad valor P
Cadera	Calcio	8 (830)	1.64 (0.70, 2.57)	<0.01	0.04
	Vitamina D	6 (896)	1.00 (0.22, 1.78)	0.01	0.32
	Alendronato 5 mg (2 añ.)	8 (8146)	3.37 (30.5, 3.69)	<0.01	0.04
	Alendronato 10–40 mg (2 añ.)	5 (1443)	4.24 (3.45, 5.02)	<0.01	0.05
	Risedronato 5 mg (1.5–3 añ.)	7 (2397)	2.73 (2.32, 3.15)	<0.01	0.85
	Etidronato (1–3 añ.)	8 (800)	2.35 (3.94, 7.44)	<0.01	0.63
	Calcitonina 350–800 IU/wk	9 (513)	3.80 (-0.32, 7.91)	0.07	<0.01
	Raloxifeno (2–3 añ.)	4 (6033)	2.11 (1.68, 2.53)	<0.01	0.13
	THS (2 añ.)	9 (1139)	4.12 (3.45, 4.80)	<0.01	0.16
Antebrazo	Calcio	6 (615)	1.91 (0.33, 3.50)	0.02	<0.01
	Vitamina D	13 (988)	3.26 (0.48, 6.05)	0.02	<0.01
	Alendronato 5 mg (2 añ.)	6 (2646)	1.15 (0.93, 1.36)	<0.01	0.95
	Alendronato 10–40 mg (2–4 añ.)	2 (565)	2.08 (1.53, 2.63)	<0.01	0.30
	Risedronato 2.5–5 mg (1.5 añ.)	1 (648)	0.70 (-0.60, 2.00)	0.29	–
	Etidronato (1–3 añ.)	4 (368)	1.11 (-1.16, 3.38)	0.34	0.24
	Calcitonina 350–800 IU/se.	8 (468)	3.02 (0.98, 5.07)	<0.01	<0.01
	Raloxifeno (1 añ.)	2 (359)	0.65 (-0.06, 1.35)	0.07	0.63
	THS (2 añ.)	14 (1225)	4.53 (3.68, 5.36)	<0.01	<0.01
Cuerpo completo	Calcio	4 (358)	2.05 (0.24, 3.86)	0.03	<0.01
	Vitamina D	4 (547)	0.65 (-0.05, 1.35)	0.07	<0.01
	Alendronato 5 mg (3 añ.)	3 (2497)	1.84 (1.46, 2.21)	<0.01	0.23
	Alendronato 10–40 mg (3 añ.)	2 (469)	2.73 (2.27, 3.20)	<0.01	0.35
	Risedronato	–	–	–	–
	Etidronato (1–3 añ.)	1 (134)	0.97 (0.39, 1.55)	<0.01	–
	Calcitonina	–	–	–	–
	Raloxifeno	2 (511)	1.33 (0.37, 2.30)	0.01	0.11
	THS (1 añ.)	6 (771)	3.50 (1.90, 5.12)	<0.01	<0.01
* Diferencia de la media ponderada calculada mediante un modelo de efecto aleatorio.					

3.3. *HORMONA DEL CRECIMIENTO*

3.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y MECANISMO DE ACCIÓN

3.3.1.1. *Biosíntesis y secreción. Generalidades*

Fue en 1921 cuando se descubrió la presencia de actividad estimulante del crecimiento en extractos de lóbulo anterior de hipófisis bovinas y un cuarto de siglo más tarde, se pudo aislar la sustancia responsable en forma purificada. Hoy se sabe que la GH se sintetiza fundamentalmente en las células eosinófilas, particularmente abundantes en las zonas laterales anterohipofisarias (Devesa *et al.*, 1992).

Químicamente, la hormona es un compuesto polipeptídico, formado por 191 aminoácidos dispuestos en una sola cadena, en la que existen 2 puentes disulfuro que unen las cisteínas que ocupan las posiciones 53 y 182 con las localizadas en las posiciones 165 y 189 respectivamente. Esta estructura, con un peso molecular de 22.650 dalton, conocida como forma 22 K, es la forma principal de secreción de la hormona por la hipófisis anterior y la más abundante, tanto en plasma como en las propias células somatotropas (Fig. 9). Se han identificado una serie de variantes cuya significación fisiológica permanece aún por conocer (García-Barros *et al.*, 2000); de ellas, la más importante, hasta el punto de representar un 20 % del total de GH en la hipófisis, parece ser la forma 20 K, en la que de manera natural, desaparecen los aminoácidos situados desde la posición 32 hasta la 46 (Devesa *et al.*, 1992) (Fig. 9) y la forma 12 K que surge por la acción de ciertas proteasas sobre la cadena de aminoácidos en los puntos 134-150 y que resulta ser más anabolizante que la forma 22 K (Díaz y Devesa 1992).

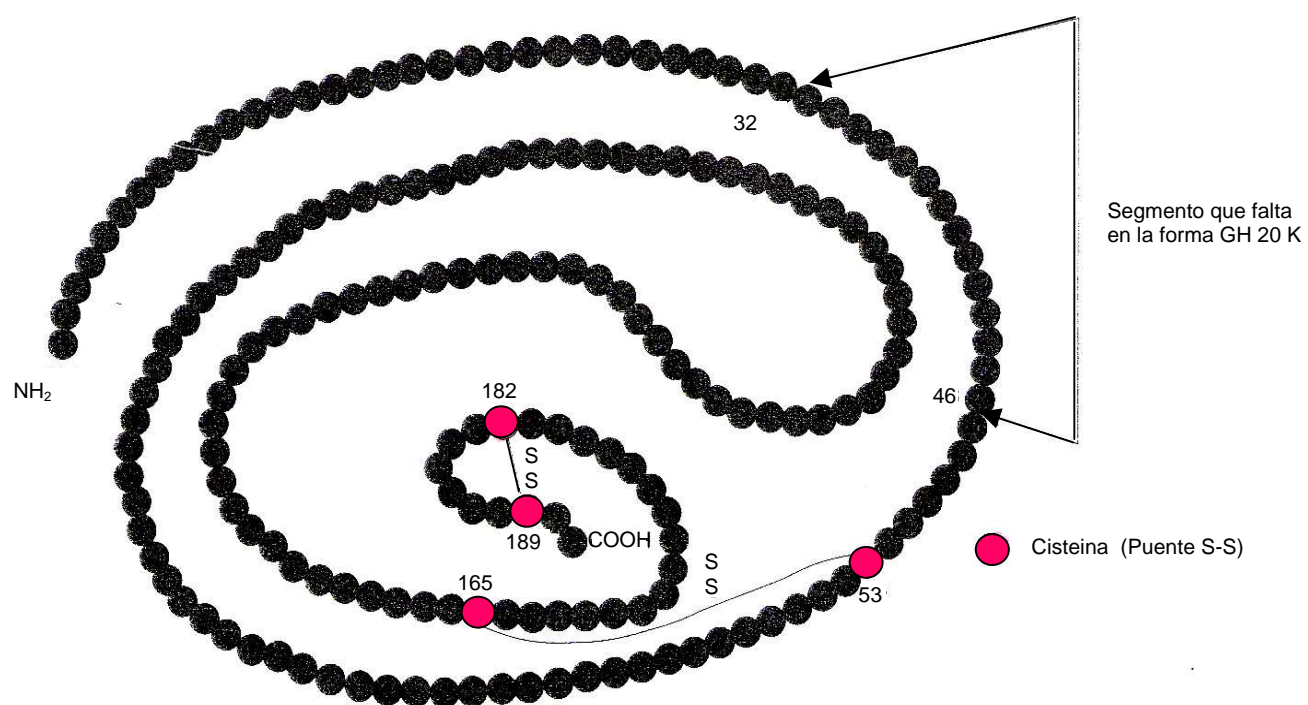


Figura 9. Representación esquemática de la forma molecular de GH 22K, y la variante 20K. (Devesa *et al.*, 1992)

3.3.1.2. Genes para GH

La heterogeneidad comienza ya a nivel de los genes para GH (GH-N y GH-V), localizados en una porción del cromosoma 17. Los resultados de García-Barros *et al.* (2000) sugieren que en la hipófisis se expresan otros genes para GH a parte del hGH-N. A partir del gen primario GH-N, que posee 5 exones separados por 4 intrones, se generan dos mRNA maduros, cuyo mensaje codifica la biosíntesis de las formas 20 y 22 K. Pero existe además un procesamiento postranslacional que lleva a la aparición de formas de GH N-aciladas, desamidadas y una serie de formas oligoméricas que, aunque no parecen ser fisiológicas, sí muestran una mayor bioactividad que la propia forma 22 K. Actualmente se sabe que la GH se compone de un conjunto de péptidos sintetizados como pro-hormonas de 217 aminoácidos y 24 Kda de peso molecular, y que tras proteólisis sucesivas irá dando lugar a otras formas activas.

3.3.1.3. Proteínas transportadoras

Aunque hasta hace poco se pensaba que la GH circulaba en el plasma en forma libre, se ha descubierto recientemente la existencia de dos proteínas transportadoras (GHBP), con lo que una parte de la hormona circula unida a dichas proteínas, formando complejos determinantes de la aparición de lo que anteriormente se conocía como «*big GH* y *big-big GH*» y se atribuía exclusivamente a mezclas de formas oligoméricas. Se sabe que una tiene alta afinidad y baja capacidad (HA-GHBP) y otra, baja afinidad y alta capacidad (LA-GHBP). La proteína de unión de alta afinidad se une a la GH 22 K, mientras que la de baja afinidad se liga a la forma 20 K (Devesa *et al.*, 1996). En estas condiciones, la vida media de la hormona en plasma es de alrededor de 25 minutos, con una tasa de secreción diaria de entre 1 y 2 mg. Se ha observado un aumento de GH libre frente a GH unida a

proteínas durante la pubertad y parece ser este incremento el responsable del “estirón” puberal (Martha *et al.*, 1993).

Se sabe que la regulación de estas proteínas transportadoras depende de factores nutricionales, ya que en el ayuno disminuyen sus niveles y aumentan en la obesidad (Martha, 1994). Curiosamente, el tratamiento con GH no tiene un efecto visible sobre los niveles de GH-BP, más bien es la producción de GH la que se ajusta a los niveles plasmáticos de GH-BP/receptor que son característicos de cada individuo (Martha *et al.*, 1992), estando estos niveles directamente relacionados con el índice de masa corporal y siendo inversamente proporcional a la concentración media de GH de 24 horas (Martha *et al.*, 1993).

3.3.1.4. *Receptores de GH*

Como ya se ha comentado anteriormente, la hormona del crecimiento puede circular libremente en el plasma, ya que pertenece al grupo de hormonas peptídicas, aunque lo suele hacer unida a proteínas plasmáticas que aumentan su vida media. Para producir su efecto, la GH tiene que unirse a un receptor específico.

El receptor de la GH (GHR) es una proteína de 620 aminoácidos y 130 kDa de peso molecular, situada en la membrana celular, que consta de tres regiones: intracelular, transmembrana y extracelular. Se sabe que está codificada por un único gen localizado en el cromosoma 5 (Devesa *et al.*, 1996). Existen receptores para GH en fibroblastos, osteoblastos (Barnard *et al.*, 1991, Nilsson *et al.*, 1995; Ohlsson *et al.*, 1994), tejido adiposo, linfocitos, pero sobre todo en músculo e hígado. Los receptores para GH se localizan preferentemente en la membrana de las células-diana, pero también se han aislado receptores en el citoplasma y en el núcleo.

Actualmente se considera la pertenencia del GHR a la superfamilia de receptores hematopoyéticos (Costoya *et al.*, 1999). Dentro de éstos se encontrarían los receptores para prolactina, eritropoyetina, IL-2, -3, -4, -5, -6, -7 y -9, GM-CSF, LIF e IF α , β y χ .

Se ha observado que cada molécula de GH se une a dos moléculas de receptor. De esta forma tiene lugar un fenómeno de dimerización de ambos receptores, formándose puentes disulfuro. Esto implica que para que se produzca el efecto biológico de la hormona es preciso una concentración adecuada de la misma. De tal forma que si ésta es muy elevada, no se formarán dímeros y el efecto biológico no tendrá lugar.

Cuando la GH se liga al receptor situado en la membrana de las células diana, se produce la homodimerización de dicho receptor, que da como resultado la asociación y activación de la JAK2, la tirosin kinasa asociada al GHR. Una vez activada la JAK2, ésta induce la fosforilación de la cascada de moléculas implicadas, incluyendo a la propia kinasa y a la porción citoplasmática del receptor. Entonces, la fosforilación de la tirosina tanto del JAK2 como del receptor deja al descubierto los lugares de anclaje para las moléculas que contienen el dominio SH2, entre las que se incluyen el STAT, proteínas, fosfatasas, los substratos -1 y -2 del receptor insulínico (IRS1 y -2) y PI-3K (fosfoinositol 3-kinasa), así como ciertas moléculas implicadas en la activación de la vía proteín-kinasa activada por Ras/mitógeno (Costoya *et al.*, 1999, Ohlsson *et al.*, 1998).

En contra de lo que ocurre con otras hormonas peptídicas, la GH también puede ser internalizada tras unirse al receptor, esto es, se produce una invaginación de la membrana a la altura del complejo hormona-receptor, dando lugar a un endosoma, lo que permite su acumulación en los distintos compartimentos celulares (Devesa *et al.*, 1996). De este

modo, es capaz de alcanzar el núcleo de la célula diana, ya sea como GH intacta o como producto de la degradación lisosómica.

En los osteoblastos de ratón, se ha visto que la GH induce los protooncogenes nucleares *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* y Jun B (Zhu *et al.*, 1998; Hodge *et al.*, 1998) y se ha constatado que la transmisión de la señal depende de una forma de proteinkinasa C.

La regulación de la expresión del receptor viene determinada por la presencia de factores nutricionales principalmente, pero también por factores hormonales. Así, en ratas sometidas a ayuno, se observa una disminución en el número de receptores (Devesa *et al.*, 1996). La propia GH juega un papel importante en la regulación del GHR, ya que el tratamiento con esta hormona provoca un aumento de la fosforilación de las proteínas JAK2 y STAT3 asociadas al GHR, por lo que induce su activación (Costoya *et al.*, 2000).

Se sugiere la existencia de un *feed-back* local del eje GH-IGF a nivel de los tejidos. Por tanto, y de forma hipotética, el IGF disminuye el número y la actividad de los GHRs, regulado finamente por la presencia de IGFBPs (Slootweg *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1996). Leung y colaboradores (1996) sugieren que este *feed-back* del eje GH / IGF-I en el tejido óseo puede implicar tres mecanismos:

- El IGF-I producido y segregado por el hígado inhibe la secreción de GH en la glándula pituitaria.
- El IGF-I producido en hueso inhibe también la secreción de GH pituitaria.
- El IGF-I producido en hueso inhibe la acción local de GH al reducir la disponibilidad de GHR.

El ácido retinoico es otro factor que modifica la expresión de GHR incrementando su número en osteoblastos de ratón (Slootweg *et al.*, 1997).

Se sabe que los estrógenos ejercen importantes efectos sobre el tejido óseo, y se ha observado que interactúan con la acción de la GH a nivel celular. En osteoblastos humanos y de ratón, el 17 β -estradiol favorece la proliferación estimulada por GH e incrementa la unión de [125 I] GH y los niveles de mRNA de GHR (Slootweg *et al.*, 1997).

Asimismo, altos niveles de glucocorticoides inducen un incremento en la unión de [125 I] GH y en los niveles de GHR en células de osteosarcoma en ratas y en osteoblastos humanos.

Por el contrario, los niveles altos de corticosteroides disminuyen los efectos de GH en osteoblastos y en condrocitos de la placa de crecimiento de ratas (Jux *et al.*, 1998).

3.3.1.5. Control de la secreción de GH

Hacia el final del primer trimestre del embarazo se puede ya detectar GH en el suero fetal en concentraciones progresivamente crecientes hasta la semana 20 de gestación. A partir de entonces comienza un lento declinar, hasta que hacia el primer año de vida encontramos ya, en condiciones basales, niveles circulantes de la hormona similares a los que se observan en el adulto. Como la GH no parece jugar ningún papel en el crecimiento fetal, la existencia de tan altos niveles de la hormona puede estar dirigida a la diferenciación durante los procesos de organogénesis. Tras el nacimiento, tanto en el hombre como en todos los animales estudiados, se ha demostrado que existe un patrón ultradiano de secreción espontánea de GH, con episodios de brusca liberación que, en nuestra especie, aparecen entre 4 y 8 veces en cada período de 24 horas. Existe, por tanto, un ritmo secretor endógeno cuya máxima amplitud se alcanza en la primera fase del sueño de ondas lentas.

En la actualidad existen abundantes evidencias indicativas de que la secreción de GH depende de la actuación concertada, a nivel hipofisario, de dos péptidos hipotalámicos: GHRH (estimulante) y SS (inhibidor), que llegan por vía portal hipotálamo hipofisaria a las células somatotropas.

El origen del patrón rítmico de secreción pulsátil de GH ha sido muy estudiado, habiéndose observado que la aparición de cada episodio secretor de GH viene determinada por la liberación de GHRH a la circulación portal, con la disminución simultánea del tono inhibitorio que la SS ejerce sobre las células somatotropas. De esta forma, se establecería un ritmo de secreción, con GHRH y SS desfasados en 180°. También es posible que la secreción episódica de GH ocurra por una secreción más o menos continua de GHRH modulado en su actuación por una secreción rítmica de SS.

La secreción rítmica no es sólo privativa de la GH, sino que aparece en muchas hormonas, en donde puede llegar a ser determinante de la acción biológica. Esta secreción pulsátil estaría encaminada a evitar los procesos de desensibilización en los receptores para GH de los tejidos diana.

Admitida la significación funcional de la secreción pulsátil de GH, el problema pendiente de resolver es saber cómo se establece el ritmo previo de secreción de GHRH y SS determinante de aquél (Devesa *et al.*, 1992).

3.3.1.6. GHRH

Desde el punto de vista bioquímico, se trata de un péptido perteneciente a la familia glucagón-secretina, estructuralmente similar al péptido histidina isoleucina (PHI) previamente aislado del tracto gastrointestinal. En el hipotálamo humano, se presenta bajo dos formas moleculares, de 40 y 44 aminoácidos, con similar actividad biológica, fabricadas a partir de dos precursores, prepro-GHRH, compuestos por 107 ó 108

aminoácidos, cuyo gen se localiza en el cromosoma 20.

El mayor cúmulo de cuerpos neuronales productores de GHRH se encuentra en el hipotálamo mediobasal, particularmente en los núcleos arcuato y ventromedial. Del núcleo arcuato parte una densa trama de proyecciones axónicas hacia la eminencia media, donde descargan en el plexo vascular primario del sistema porta hipotálamo-hipofisario. También está presente en las células del sistema inmunitario y recientemente se ha visto que, *in vitro*, modula la secreción de IL-6 de las células humanas mononucleares de sangre periférica (Siejka *et al*, 2005).

El GHRH es sumamente específico, induciendo la liberación hipofisaria de GH, y estimulando la transcripción del gen de dicha hormona y los procesos de diferenciación de las somatotropas primarias.

Al igual que otras hormonas peptídicas, el GHRH pone en marcha sus acciones biológicas tras ligarse a un receptor de membrana en las células somatotropas mediante el estímulo del AMPc, que lleva a la activación de las proteinkinasa I y II, inductoras de la fosforilación de sustratos proteicos que actúan como mediadores intracelulares. Por otra parte, la GHRH produce además una muy rápida movilización de calcio, paralela a la liberación de GH; este mecanismo parece independiente de la generación de AMPc. La acción del calcio iónico está mediada por su unión a la calmodulina.

De los datos expuestos resulta, por tanto, que la liberación de GH inducida por GHRH no es solamente consecuencia de la activación del sistema de adenilato-ciclase, sino que también participa, y de forma coordinada, el sistema calcio-calmodulina.

La GHRH podría inducir también la proliferación de las células somatotropas, incrementando el número total de células productoras de GH.

La actividad biológica de GHRH reside en sus primeros 29 aminoácidos. Esta es la razón por la que se han desarrollado péptidos sintéticos (GRF 1-29), que poseen la

misma potencia que las formas naturales, y que por ello se utilizan en clínica.

3.3.1.7. Factores metabólicos y secreción de GH

Puesto que la GH es un importante regulador metabólico, parece lógico que, a su vez, la secreción de esta hormona pueda estar modulada por los niveles circulantes de principios inmediatos y/o metabolitos. De esta manera, las variaciones plasmáticas de glucosa, ácidos grasos y determinados aminoácidos van a ser importantes condicionantes en el funcionalismo somatotropo.

Glucosa. La elevación aguda de la glucemia en el individuo normal va a inhibir la secreción de GH, mientras que el descenso relativo de su concentración plasmática (brusco y mayor del 40-50 por ciento), va a ser un potente factor estimulante. Estas variaciones bruscas de la glucemia son detectadas por unas neuronas localizadas en el hipotálamo ventromedial y ventrolateral.

La glucosa inhibe la secreción de GH aumentando la liberación de SS, bien a través de la activación de las neuronas glucoceptoras citadas o bien porque las propias neuronas SS son capaces de responder directamente al azúcar. Así, el descenso de la glucemia inhibirá la liberación de SS, con el consiguiente incremento de GH, que tiende a incrementar los niveles de glucemia.

Ácidos grasos (FFA). El cambio agudo en los niveles circulantes de FFA produce los mismos efectos cualitativos sobre la secreción de GH que las variaciones de glucemia. Así, el aumento de FFA tiene carácter inhibitor y su disminución estimula la liberación de la hormona de crecimiento. Probablemente la regulación por FFA sea bastante más potente que por glucosa, pues su elevación plasmática inhibe los picos de GH asociados al sueño, lo que no ocurre con la infusión de glucosa.

Curiosamente, pese a que el efecto neto de glucosa y FFA es cualitativamente similar, las neuronas hipotalámicas que responden a las variaciones de glucosa también responden a las variaciones de FFA, aunque de forma opuesta. La significación fisiológica de este fenómeno se desconoce.

El estímulo de la secreción de SS y/o un efecto inhibitorio directo a nivel hipofisario, sería el mecanismo por el que los FFA inhiben la liberación de GH; lo que podría explicar el comportamiento distinto de los FFA y la glucosa sobre las neuronas hipotalámicas, pese a que el resultado obtenido sobre la secreción de GH sea el mismo.

Aminoácidos. Aunque no todos los aminoácidos se muestran activos en el control de GH, algunos, como arginina y ornitina fundamentalmente, son potentes estimuladores. Parece que su acción se basaría en la estimulación del GHRH hipotalámico.

3.3.1.8. *Control central de la secreción de GH*

El control primario de la secreción de GH parece establecerse en estructuras extra o suprahipotalámicas. Existiría entonces un marcapasos central determinante de la puesta en marcha del ritmo basal de secreción alternante de GHRH y SS, que llevaría al patrón de secreción espontánea de la hormona. Este patrón básico sería de carácter ultradiano, con un ciclo de entre 3 y 5 horas según la especie animal. De forma ya clásica, se conoce la existencia de una íntima relación entre sueño y secreción de GH, de forma que entre media y una hora después de iniciado el sueño de ondas lentas, se produce un gran episodio secretor de la hormona. La hipótesis actual es que esta gran bolsa de liberación de GH estaría ligada al ciclo luz-oscuridad, actividad-descanso, cuyo mediador es el núcleo supraquiasmático. Es probable, por tanto, que la información procedente de este centro, bien directamente vía ganglio cervical superior o tras su actuación sobre la glándula pineal (modulando la liberación de melatonina) establezca el ritmo alternante de base GHRH-SS. También las vías

colinérgicas y α adrenérgicas podrían jugar aquí un papel relevante. Desde un punto de vista funcional, la gran secreción de GH asociada al sueño serviría para la regeneración tisular tras la actividad diaria.

La propia GH juega un importante papel regulador de su propia secreción. El mecanismo sería del tipo retroalimentación negativo corto, mediante una combinación de incremento de síntesis y liberación de SS y disminución de liberación de GHRH.

Los glucocorticoides (GCs) tienen una función relevante en la fisiología del eje hipotálamo-somatotrofo ya que aumentan la transcripción génica de GH así como la síntesis del receptor de GHRH. Pero el exceso de estas hormonas inhibe la liberación de GH mediante el aumento de la secreción hipotalámica de SS, mediada por el incremento de la respuesta beta-adrenérgica inducida por GCs (Devesa *et al.*, 1995).

Toda esta serie de factores determinan que el control de la GH sea muy complejo, como puede verse en la figura 10 (Fig. 10).

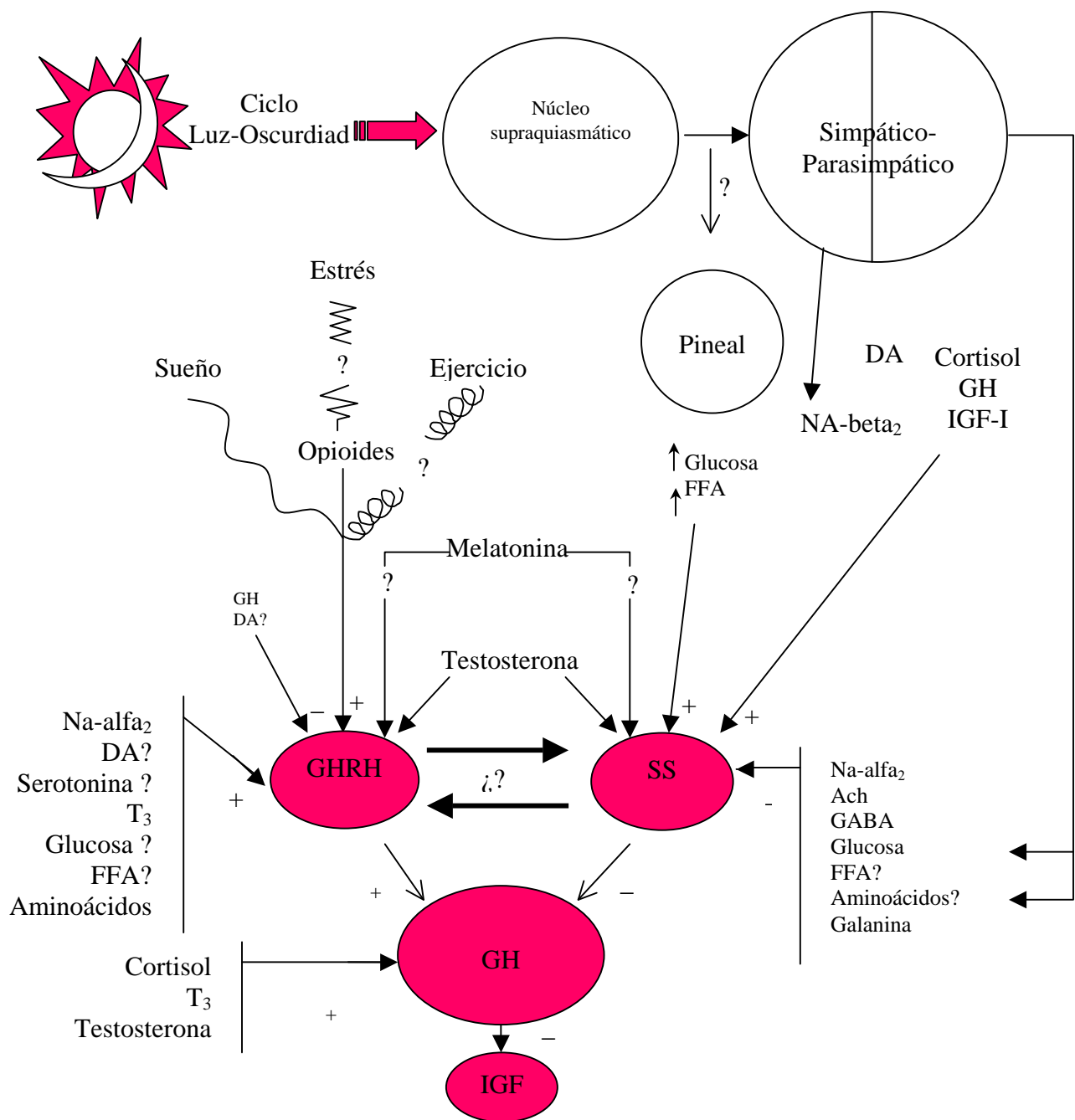


Figura 10. Regulación de la secreción de GH (+ estimula; - inhibe). (Modificado de Devesa *et al.*, 1992)

3.3.1.9. Somatomedinas (IGF)

En un estudio realizado por Salmon y Daughaday en 1957 se observó que, *in vitro*, la hormona GH no era capaz de estimular el crecimiento del cartílago, lo que sí ocurría cuando al cultivo se le añadía plasma de animal normal. Estos autores, entonces, postularon la existencia de un factor plasmático responsable, diferente pero dependiente de GH, ya que no se encontraba en el plasma de animales hipofisectomizados, pero reaparecía cuando éstos eran tratados con GH exógena (Devesa *et al.*, 1992).

A este factor se le denominó factor de sulfatación, ya que su acción básica era la de estimular la incorporación de sulfato a los proteoglicanos del cartílago. Más tarde se constató que también podía intervenir en bastantes actividades metabólicas, pasando a ser conocido con el término somatomedina, con el que se expresaba su actividad de mediador del crecimiento somático.

Actualmente, se sabe que lo que anteriormente se denominaban somatomedinas son, en realidad, dos formas peptídicas estructural y funcionalmente similares a la insulina, por lo que se propuso el término de “*Insulin-like Growth Factors*” (IGF I y II) con el que se resalta tanto su analogía con la hormona pancreática como su papel sobre el crecimiento. Como no se ha llegado a establecer un consenso general, hoy se siguen manteniendo indistintamente ambas denominaciones (Devesa *et al.*, 1992).

A. Estructura y distribución

Desde un punto de vista químico, el IGF-I es un péptido básico compuesto por 70 aminoácidos con un peso molecular de 7.469 daltons, que presenta una secuencia aminoacídica muy similar a la de la proinsulina. El IGF-II está compuesto por 67 aminoácidos y es también muy similar a la proinsulina.

Los IGF no parecen sintetizarse de forma especial en ningún órgano en particular. El hígado parece ser el principal lugar de producción y la fuente primordial de IGF circulante, aunque esto no significa que desde un punto de vista fisiológico sea el más importante, ya que también se sintetiza en el propio tejido condral (Isaksson *et al.*, 1987) bajo el estímulo de la GH (Tresguerres, 1992). Numerosos tejidos son capaces de sintetizar estos péptidos, permitiendo así que actúen localmente estimulando el crecimiento de manera auto y paracrina. Según esto, la GH actuaría como estimulante de la multirrespuesta tisular de fabricación de somatomedina y crecimiento locales.

B. Proteínas transportadoras

En plasma, solamente un 1 % del IGF total circula en forma libre. El 99 % restante lo hace ligado a proteínas transportadoras (IGFBP) por lo que tienen una vida media muy larga. Forman complejos, (se han identificado seis: de IGFBP-1 a IGFBP-6) entre los que destaca el IGFBP-3, principal forma de transporte de IGF-I y II, controlado directamente por la GH (más del 80% de los IGFs plasmáticos se hallan circulantes como parte de un complejo dependiente de GH, de 150 kDa, que se compone de tres unidades: IGF-I o II, IGFBP-3 y una subunidad ácido lábil o ALS).

La función de estas proteínas no sería solamente de transporte como tal, sino la de establecer un reservorio plasmático de IGF ya que mientras el IGF libre posee una vida media corta, de unos 10-20 minutos, la del complejo 150 K es de unas 18 horas, haciendo que los niveles plasmáticos se mantengan de forma bastante estable. Sin embargo, parece que es la forma libre la biológicamente activa pues mientras en la pubertad el aumento de secreción de GH no va acompañado de un aumento importante de IGF total en el plasma, los niveles de IGFBP 35 K disminuyen, permitiendo al organismo disponer de una mayor

fracción libre del péptido, lo que se asocia al mayor crecimiento de este período. Esta unión a las proteínas es lo que impide sus acciones tipo insulina.

C. Receptores de IGF

A nivel celular existen dos tipos de receptores para IGF: el tipo I, con gran afinidad para IGF-I, intermedia para IGF-II y poca para insulina; y el tipo II, que reconoce preferentemente IGF-II, sin ligar insulina. La concentración de estos receptores en la superficie celular está en relación inversa con los niveles de IGF y se observan fenómenos de *down-regulation* (desensibilización).

D. Control de IGF-I

La GH estimula la secreción de IGF-I, por el hígado y seguramente también por otros tejidos, de forma que mientras en el plasma de sujetos con déficit de esta hormona existe una disminución de los niveles de IGF-I (que rápidamente revierte al administrar GH exógena), está sumamente aumentada en los pacientes acromegálicos.

Existe un circuito de tipo *feed-back* entre GH e IGF-I. La elevación de la somatomedina C circulante determina una inhibición de la liberación de GH, por estímulo de la secreción de SS hipotalámica, aunque no se descarta el que también pueda tener una acción inhibitoria sobre GHRH o incluso directa sobre las células somatotropas. Hay otras hormonas como la insulina o las hormonas tiroideas que también contribuyen a que la biosíntesis de IGF se desarrolle normalmente. Los esteroides sexuales juegan al parecer un papel más importante. Durante la pubertad, los cambios en sus niveles plasmáticos parecen ser precisamente la causa del incremento del IGF-I que aparece en el “estirón puberal”.

La síntesis hepática de IGF-I depende marcadamente del estado nutricional del organismo. Así, en situaciones de desnutrición, aunque sea normal la secreción de GH, los

niveles plasmáticos de IGF-I son muy bajos. La normalización del estado nutricional se acompaña de la recuperación de los valores normales del péptido, ya que el organismo precisa de una adecuada entrada de calorías y del aporte de aminoácidos esenciales para biosíntesis hepática de IGF-I.

Tras la madurez sexual, con la edad, los niveles plasmáticos de este factor van decayendo, de forma bastante paralela a lo que ocurre con la secreción de GH. Sin embargo, la concentración de IGF-II no depende de la edad y alcanza niveles tres veces superiores a los de IGF-I. Su función está todavía por descubrir, pero se ha relacionado con el desarrollo fetal (Spagnoli y Rosenfeld, 1996) y con la regulación de la grasa corporal (Helad *et al*, 2006).

E. Acciones biológicas de IGF-I

Atendiendo a su latencia de acción podríamos distinguir aquellos efectos de IGF-I que ocurren de forma aguda y los que se manifiestan más tardíamente. Los primeros son tipo insulina, mientras que los efectos crónicos se muestran preferentemente en el ámbito del crecimiento y la diferenciación celular.

Efectos agudos. Las acciones tipo insulina se caracterizan por un rápido descenso de la glucemia, debido al aumento de la captación celular de glucosa y al incremento de la glucogenogénesis, lo que está muy relacionado con el crecimiento óseo, puesto que el IGF-I es 50 veces más potente que la insulina en la síntesis de glucógeno; teniendo en cuenta que la concentración plasmática de IGF-I es dos mil veces mayor que la de insulina, parece ser su unión a las proteínas plasmáticas lo que evita un estado de hipoglucemia permanente. La latencia en la recuperación de la glucemia basal es idéntica tras insulina o Sm C. También se produce una disminución de los niveles plasmáticos de FFA, que se recuperan más rápidamente cuando se administra IGF-I.

Efectos crónicos. El IGF-I actúa como un débil mitógeno, y un potente factor de diferenciación que mantiene a las células en un estado altamente diferenciado. En este sentido estimula la síntesis de DNA y la proliferación celular en un gran número de tipos celulares: fibroblastos, condrocitos, músculo liso, células de Sertoli testiculares y células de la granulosa ovárica.

Su administración produce (además de los efectos metabólicos agudos citados) las siguientes acciones de tipo hormonal: incremento de la velocidad de crecimiento, aumento del espesor de la epífisis tibial (expresión del efecto sobre los condrocitos), aumento de la incorporación de timidina y sulfato al cartílago, y aumento del peso de órganos tales como riñón, bazo y timo. Además, juega también importantes papeles locales de tipo auto- y paracrino.

En lo que al crecimiento óseo se refiere, tanto la GH como los IGFs, fundamentalmente IGF-I, son capaces de estimular el crecimiento óseo, de forma dosis-dependiente, por estimulación directa de los condrocitos epifisarios (Isaksson *et al.*, 1982. Russell y Spencer, 1985). Cuando se administra GH de forma local, ejerce sus efectos sobre las células condroprogenitoras, estimulando su proliferación y diferenciación, mientras que el IGF-I actúa sobre los condrocitos ya maduros, estimulando tanto su proliferación como la síntesis de la matriz (Carrascosa y Audi, 1996). No se han comprobado sus efectos sobre la mineralización del cartílago de conjunción, a diferencia de lo que ocurre con la T₃, que estimula la mineralización del cartílago y no la proliferación celular (Carrascosa y Ferrández, 1992).

Por otro lado, IGF-I y II son los factores de crecimiento más abundantes en el hueso y estimulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (Canalis *et al*, 1989 b), a la vez que potencian la síntesis de colágeno e inhiben su degradación. Las acciones de estos

IGFs están reguladas por la IGFBP-3, cuya producción *in vivo* está bajo el control de la GH (Tresguerres, 1996). Se sabe que la IGFBP-5 estimula la proliferación de osteoblastos directamente y a través de IGF-I, por lo que podría mediar en las acciones anabólicas de la GH sobre el hueso (Chihara y Sugimoto, 1997). Se ha implicado a los IGFs como mediadores de los efectos que varias hormonas poseen sobre el *turn-over* óseo: GH, estrógenos, progesterona, esteroides, PTH (Canalis *et al*, 1989 a), incluso BMP y citoquinas (Langdahl *et al*, 1998). IGF-I se encuentra en la matriz ósea en una proporción entre 10 y 15 veces menor que IGF-II, por lo que podría ser éste el que actúe en el hueso.

Es muy probable que insulina e IGF-I sean hormonas que no sólo presenten una gran homología estructural y evolutiva, sino también productos fisiológicamente relacionados para actuar de forma concertada en el organismo: la insulina sería responsable de la regulación aguda de la homeostasis metabólica y de los depósitos energéticos, mientras que IGF-I se encargaría principalmente de la diferenciación celular y de los lentos procesos de crecimiento. Estas sustancias serían, entonces, los dos principales compuestos anabolizantes, que permitirían que la regulación metabólica, el crecimiento y la diferenciación celular ocurriesen de manera concertada.

Un estudio de Ohlsson y colaboradores (2000) desmonta parcialmente la hipótesis clásica de la regulación de la somatomedina en la que se postula que la mayor parte del IGF-I que circula en la sangre se sintetiza en el hígado y que el crecimiento corporal está controlado por la concentración de este factor en sangre. Utilizaron ratones en los que abolieron la producción hepática de IGF-I mediante el sistema recombinante Cre/loxP. Los animales experimentaron una reducción de los niveles en suero de IGF de más del 75% asociado con un aumento de los valores de GH sérica. Por el contrario, demostraron un

crecimiento postnatal normal, lo que indica que la acción autocrina/paracrina del IGF extrahepático es el factor determinante en el crecimiento postnatal. Proponen una “hipótesis dual de la somatomedina” según la cual: (1) el IGF-I autocrino/paracrino es el principal determinante del crecimiento corporal postnatal y (2) la acción endocrina del IGF-I sintetizado en hígado tiene un efecto negativo sobre la retroalimentación de la secreción de GH y posiblemente tenga también otros efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos.

3.3.2. ACCIONES GENERALES DE LA GH

3.3.2.1. Acciones biológicas de GH.

A. Crecimiento

La GH estimula el crecimiento somático y actúa sobre el metabolismo intermediario estimulando el anabolismo proteico y la lipólisis. La marcada acción anabolizante de la GH se hace patente de forma inmediata tras la administración de la hormona a animales hipofisoprivos o niños GH-deficientes por activación de todos los procesos implicados en la neosíntesis proteica. En estas situaciones, el balance nitrogenado, negativo, pasa a ser fuertemente positivo, con disminución de los niveles plasmáticos de aminoácidos y urea, así como de la excreción urinaria de este catabolito aminoacídico. La hormona de crecimiento promueve un mayor aporte de aminoácidos a los tejidos, facilitando los procesos de biosíntesis y disminuyendo los del catabolismo proteico. Paralelamente, se produce una mayor retención de potasio, fosfato, magnesio, calcio, sodio y cloruro. Aunque los efectos anabolizantes de la hormona de crecimiento ocurren en tejidos tan distintos como hueso, cartílago o músculo, y en una variada serie de vísceras (corazón, pulmones, hígado, riñones, intestino) y glándulas (páncreas, suprarrenales), quizá es en músculo e hígado donde alcanzan mayor expresión.

A nivel muscular se observa un incremento del transporte de aminoácidos al interior de la célula, que aparece rápidamente y es bloqueable por inhibidores de la síntesis proteica. Unas horas más tarde hay un claro aumento del RNA ribosómico, de la síntesis de DNA y de la neosíntesis proteica. Estos mismos fenómenos se observan en el hígado, donde la GH promueve la fabricación de un gran número de proteínas (entre ellas el IGF-I) y de ácidos nucleicos.

La síntesis de nuevas proteínas es un fenómeno clave para el crecimiento, tanto somático como visceral. El crecimiento somático va a efectuarse fundamentalmente a expensas del crecimiento óseo que, tras el nacimiento, va a ser directamente dependiente del sistema GH- IGF, aunque otras hormonas, principalmente las tiroideas y los esteroides sexuales, también van a jugar un importante papel modulador local.

El crecimiento del hueso puede ser en longitud y en espesor. El desarrollo longitudinal depende del cartílago de crecimiento, que bajo la acción de la GH determina el alargamiento diafisario, mientras que el aumento de espesor se produce por aposición perióstica. Histológicamente, el cartílago de conjunción o crecimiento es una zona de gran multiplicación de condrocitos, que bioquímicamente se caracteriza por una intensa síntesis de grandes moléculas del grupo de los proteoglicanos, responsables de la estructuración de la trama ósea (Fig. 11). Durante el desarrollo, tanto la proliferación celular como la síntesis de macromoléculas están perfectamente compensadas, de tal forma que pese a la constante neoformación ósea siempre existe un espesor de cartílago que permite que el proceso continúe. Tras la pubertad, el aumento de niveles circulantes de esteroides sexuales, al bloquear la proliferación del cartílago y dar lugar a su desaparición, va a poner fin al crecimiento longitudinal del organismo. El crecimiento óseo va a depender fundamentalmente de la GH, con la excepción de la mayor parte de los huesos del cráneo y cara, en los que la regulación parece primordialmente intrínseca genética y no GH-de-

pendiente.

Si un niño presenta un déficit de GH, éste dará lugar al cese o disminución del crecimiento lineal, ya que se interrumpen los procesos de proliferación y transformación de los condrocitos y se adelgaza el disco epifisario. El tratamiento con GH exógena estimula la condrogénesis y la aparición de osteoblastos. Sin embargo, sigue sin estar totalmente claro el mecanismo de actuación de la hormona.

Desde el punto de vista bioquímico, se ha comprobado que en cartílago y hueso la GH incrementa la incorporación de SO_4 a los proteoglicanos, la incorporación de timidina en el DNA condrocítico y la conversión de prolina en hidroxiprolina en el colágeno. El que estos efectos no se observasen *in vitro* hizo suponer que la hormona no actuaba directamente, sino a través de un factor presente en el plasma de sujetos normales, pero ausente en los GH-privos que, como ya se ha comentado anteriormente, posteriormente fue identificado y denominado somatomedina (mediador de la acción de la hormona somatotropa).

La acción de la GH sobre el crecimiento óseo longitudinal queda así subordinada a la fabricación periférica, en tejidos tales como el hígado, de un factor mediador responsable último de esta acción, estableciéndose entonces un eje GH - somatomedina - crecimiento.

Datos más recientes, sugieren, sin embargo, la existencia de un sistema mucho más complejo, según el cual la propia hormona sería capaz de actuar también directamente sobre el cartílago de crecimiento. Así, la GH y la somatomedina estimularían diferentes poblaciones de condrocitos y la GH induciría directamente la diferenciación de estas células, haciendo que expresen el gen codificador de somatomedina. Los condrocitos diferenciados comenzarían a producir somatomedina, y ésta desencadenaría la proliferación clonal y maduración de nuevos condrocitos por

mecanismos auto o paracrinós.

De esta forma, en la secuencia ordenada de acontecimientos que tienen lugar en la maduración celular en el cartílago, y que llevan el crecimiento longitudinal del hueso, la GH sería el primer desencadenante y la somatomedina el segundo.

Una vez que se fusionan las epífisis por acción de las hormonas sexuales, tras la pubertad, la hormona ya no es capaz de continuar induciendo crecimiento lineal del hueso, aunque sí persiste un efecto sobre el ensanchamiento de éste a expensas del crecimiento perióstico.

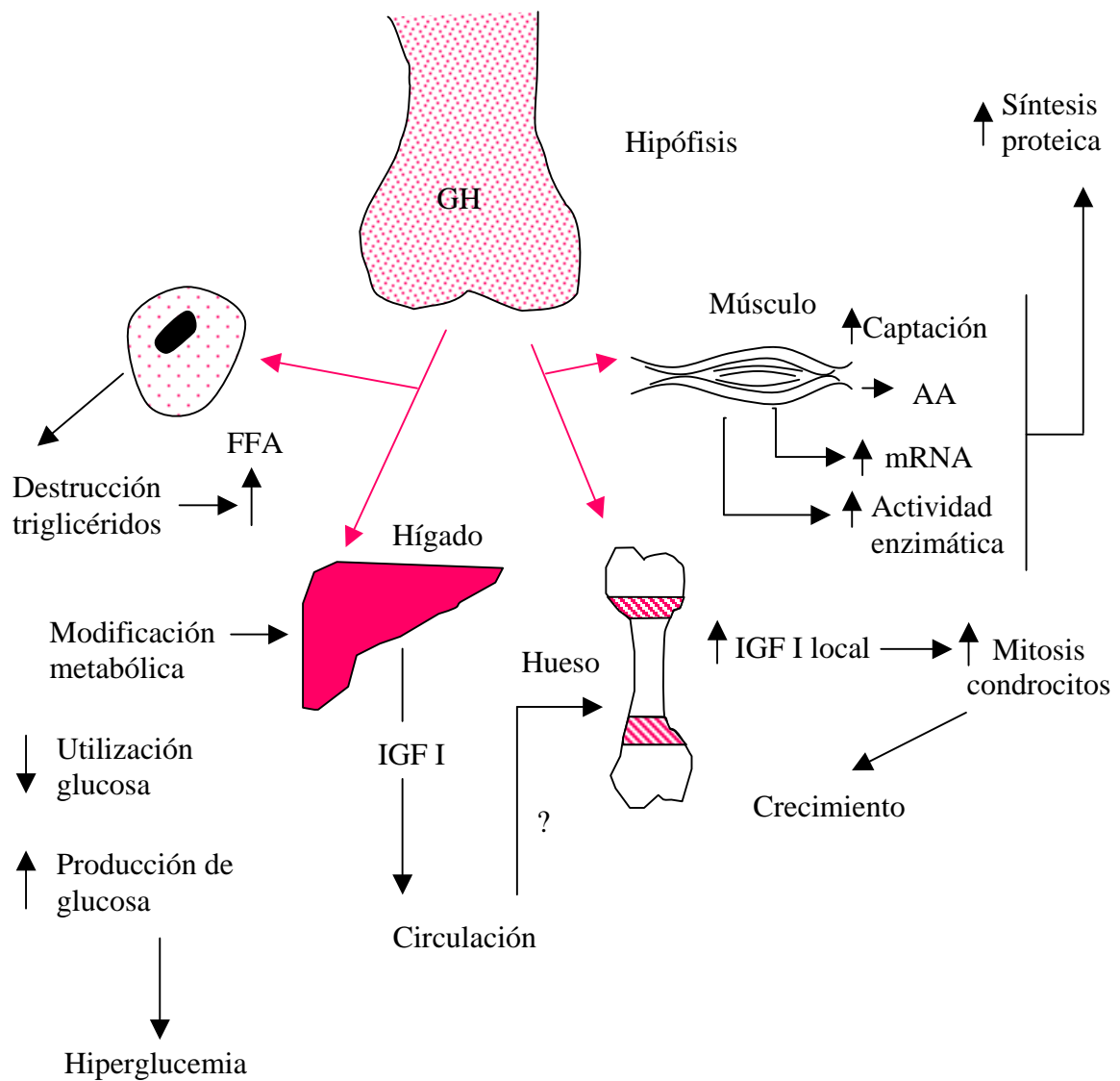


Figura 11. Acciones biológicas de la GH. (Modificado de Devesa *et al.*, 1992)

B. Acciones lipolítica y diabetógena (de GH)

Hace más de 50 años el investigador argentino B. Houssay, Premio Nobel de Fisiología, describió hipersensibilidad a la insulina en animales hipofisectomizados y atribuyó dicho efecto a la ausencia de GH circulante en estos animales. Los efectos de la GH sobre el metabolismo glucídico y el lipídico son aparentemente contradictorios en muchas ocasiones.

La administración de GH a animales hipofisectomizados o niños GH-deficientes, produce una rápida caída de la glucemia, aunque el efecto es de pequeña cuantía y escasa duración. Lo propio ocurre con los niveles de ácidos grasos libres en plasma (FFA) (Fig. 12). Estas acciones tipo insulina de la GH parecen ser debidas al incremento de IGF-I y no parece probable que jueguen un papel fisiológico realmente importante, ya que solamente se manifiestan de forma aguda tras la administración de la hormona de crecimiento a sujetos o animales previamente carentes de ella. En un organismo normal la propia secreción endógena de GH induciría un estado refractario para estos efectos insulínicos.

Por ello, es más importante la acción antiinsulínica de la GH. La administración crónica de GH a animales hipofisectomizados eleva las concentraciones basales de glucosa en plasma, aumentando la producción hepática de este monoglícido. En perros, se ha descrito que el tratamiento con dosis altas de GH puede llevar a la producción de una diabetes permanente. La causa radica, fundamentalmente en que el marcado antagonismo periférico que la GH ejerce sobre la insulina produciría un hiperinsulinismo compensatorio inicial, tras el cual el progresivo agotamiento de la célula beta pancreática llevaría a la alteración metabólica crónica. La secreción fisiológica de GH endógena también produce efectos antiinsulínicos, si bien éstos son de menor cuantía. Asimismo, en la hipersecreción de GH (acromegalia) coexisten intolerancia

hidrocarbonada e hiperinsulinismo, pudiendo llegar a instaurarse una auténtica diabetes.

La GH puede jugar también un papel relevante en la regulación de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, incrementando los segundos y disminuyendo los primeros. Si consideramos que la GH es la hormona responsable del crecimiento, parece lógico el que su acción básica como anabolizante proteico vaya acompañada de un efecto de destrucción de los triglicéridos de reserva y oxidación de los ácidos grasos. De esta forma, se conseguiría la energía necesaria para la fabricación de proteínas y se evitaría la destrucción de estos elementos plásticos (Fig. 12).

C. Acciones sobre el equilibrio electrolítico.

El tejido óseo participa de forma activa en la **homeostasis fosfocálcica**, ya que de los 1000-1200 gramos de calcio que hay en la economía de un humano adulto, aproximadamente el 99% se encuentra en los huesos y el resto está repartido entre el líquido extracelular y el intracelular (Prieto 1992).

Los mecanismos de regulación del calcio actúan a tres niveles: intestino, riñón y hueso. En el hueso está regulado por hormonas que: (a) aumentan la reabsorción ósea, por tanto son hipercalcemiantes (PTH, calcitriol, T₃, GCs), (b) que disminuyen la reabsorción y como consecuencia, disminuyen la calcemia (calcitonina, estrógenos) y (c) hormonas que estimulan la osteogénesis (insulina, progesterona, GH).

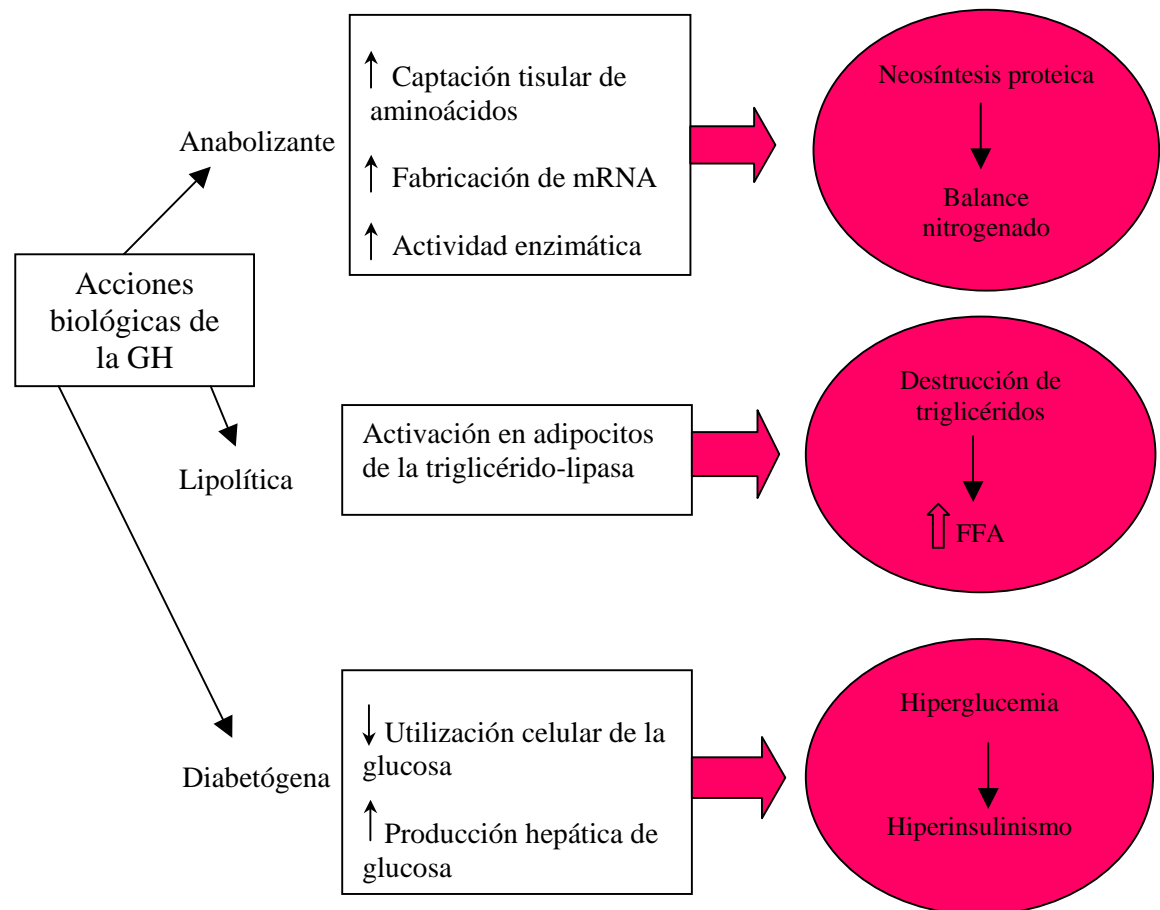


Figura 12. Acciones biológicas de GH a nivel del metabolismo intermediario. (Modificado de Devesa *et al.*, 1992).

Respecto a la GH, se sabe que posee un efecto directo sobre el riñón y el intestino, así como sobre el sistema PTH-vitamina D. Al administrar hormona de crecimiento se produce un aumento en la absorción de calcio en el intestino, disminuyendo su excreción en heces, debido a un aumento del calcitriol (Chipman *et al.*, 1980), por lo que aumenta el calcio sérico (Saggese *et al.*, 1995). En cuanto a la eliminación urinaria de calcio, las acciones de la GH son variables. Se ha visto que tanto en humanos como en animales de experimentación (Marcus *et al.*, 1990; Brixen *et al.*, 1990) la administración de GH induce un aumento de los niveles plasmáticos de calcitriol (1'25 dihidroxivitamina D₃) debido al incremento en la actividad de la 1 α -hidroxilasa renal, mediado por la acción de la IGF-1 (Bouillon, 1991). Como consecuencia de esto, se favorece la absorción intestinal de calcio y fósforo, lo que produce hipercalcemia y aumento de la excreción renal de calcio (Bouillon, 1991). Por el contrario, la administración prolongada de GH, como en los casos de acromegalia, no provoca este aumento en los niveles de calcitriol sérico. La GH también causa el aumento de los niveles séricos de fósforo, ya que hace que aumente la reabsorción tubular en el riñón.

La administración de GH provoca retención de agua y sodio (Jorgensen *et al.*, 1989), es antinatriurética, posiblemente por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Schmid, 1993), y es la causante de los edemas que aparecen al comienzo de las terapias con GH y de la hipertensión en los casos de hipersecreción de la hormona. Si bien, en sujetos con déficit de GH también se observa un aumento en la prevalencia de hipertensión (Rosen *et al.*, 1993 a).

También se ha descrito una retención de potasio en proporción directa a la de sodio (Gibney *et al.*, 1999).

3.3.2.2. Otras acciones de la GH

Además de las acciones descritas sobre el metabolismo intermediario, la GH es mediadora de la **respuesta inmune**, aumentando la actividad de las células *natural killer* (Iglesias y Díez, 1996) e incrementado la capacidad inmunitaria (Taub *et al.*, 1994).

En cuanto a la **proliferación celular**, la hormona del crecimiento es fuertemente mitogénica en las células hematopoyéticas (Isaksson *et al.*, 1988) y estimula el crecimiento incrementando la supervivencia celular por su acción antiapoptótica (Costoya *et al.*, 1999, 2000). Puesto que juega un papel relevante en la multiplicación y crecimiento celular, se ha utilizado terapéuticamente para acelerar la cicatrización de heridas en unidades de quemados (Klein *et al.*, 1998), incluso con aplicaciones tópicas en úlceras tórpidas en enfermos diabéticos (Benito y Corpas, 1991).

Tras la descripción del síndrome asociado a la deficiencia de GH (GHD), se sospechó que los pacientes con este diagnóstico presentaban un aumento en la incidencia de enfermedades **cardiovasculares** con una tasa de mortalidad cardiovascular mucho mayor de lo esperado (Rosen y Benstsson, 1990). Tras el tratamiento con GH se observó una clara disminución de los niveles de colesterol total plasmático, siendo la GH uno de los mediadores más importantes en la expresión de los receptores de las lipoproteínas LDL, pero el mecanismo por el cual actúa no se conoce con exactitud (Rudling *et al.*, 1992). La GH (vía IGF-I) (Beshyah *et al.*, 1994), aumenta la masa del ventrículo izquierdo y mejora la función cardíaca y el rendimiento cardiovascular (Koea *et al.*, 1996). Asimismo, provoca hipertrofia del miocardio y aumento de la contractibilidad cardíaca (Cuneo *et al.*, 1991).

La GH juega un papel determinante en la **composición corporal**, aumentando la masa y la fuerza muscular (Johansson *et al.*, 1997; Gibney *et al.*, 1999), disminuyendo el

tejido adiposo (Jorgensen *et al.*, 1989; Salomon *et al.*, 1989) y produciendo un incremento de la capacidad de realizar ejercicio físico. Tiene una acción lipolítica, reduciendo principalmente los depósitos de grasa visceral, más que el tejido celular subcutáneo (Bengtsson *et al.*, 1993; 1998).

En enfermos de EPOC la administración de 0.05 mg/kg de peso de rhGH mejoró significativamente el balance nitrogenado y se consiguió ganancia de peso y **aumento significativo de la presión inspiratoria** (Pape *et al.*, 1991), así como de la masa corporal (Burdet *et al.*, 1997). La administración de grelina, un péptido liberador de la hormona del crecimiento, tiene efectos anticaquéticos (Nagaya *et al.*, 2006)

La terapia con GH **favorece el balance nitrogenado positivo** en todas aquellas situaciones de catabolismo aumentado (grandes quemados, traumatismos severos, sepsis, pacientes en hemodiálisis, tras una intervención quirúrgica, etc.) (Iglesias y Díez, 1996; Kopple *et al.*, 2005), pero según un reciente estudio, este efecto es sólo beneficioso a corto plazo en enfermos críticos, por lo que habrá que esperar a que aparezcan más trabajos al respecto para contrastar opiniones (Teng Chung y Hinds, 2006).

Los cambios fisiológicos que acontecen en el cuerpo humano durante el **envejecimiento** son similares a los que se observan en la GHD. Se produce un aumento de la grasa corporal y del riesgo cardiovascular, una disminución de la masa y la fuerza muscular, la reducción de la resistencia en el ejercicio, el adelgazamiento de la piel y el empeoramiento de la calidad de vida. Estas observaciones llevaron a plantear que el envejecimiento era un déficit de GH (somatopausia) (Sherlock y Toogood, 2007) y que la terapia con la hormona mejoraría la situación. Parece que el patrón endocrino del envejecimiento es distinto de la disminución de niveles de GH/IGF-I asociada al hipopituitarismo, sin embargo, puesto que la GH juega un papel importante en el metabolismo y en la fisiología ósea, se ha utilizado en ancianos con malnutrición con muy

buenos resultados (Chu *et al.*, 2001). En ratas ancianas, el tratamiento con GH ha conseguido mejorar la función y morfología vasculares y mostrar efectos beneficiosos sobre la composición corporal (Castillo *et al.*, 2005).

El tratamiento combinado con GH, melatonina, estrógenos y fitosoja parece tener efectos beneficiosos frente a los daños producidos por la edad en SNC, hígado y piel, reduciendo el estrés oxidativo y la apoptosis (Fernández-Tresguerres, 2006).

El eje GH/IGF-I está implicado en la regulación del crecimiento, el desarrollo y la mielinización **cerebrales**. Ambas hormonas tienen efectos sobre los astrocitos, las neuronas y los oligodendrocitos, en concreto, el IGF-I incrementa la proliferación de células progenitoras y de nuevas neuronas, oligodendrocitos y vasos sanguíneos en el *gyrus dentado* del hipocampo (Aberg *et al.*, 2006).

Se sabe que la GH aumenta el número de neurotransmisores en ratas viejas, igualándolas a las jóvenes y aumenta de forma significativa la población neuronal en el hipocampo (Ariznavarreta *et al.*, 2003). Las alteraciones producidas en la señal del eje GH/IGF-I pueden aumentar la esperanza de vida en estos animales (Selman *et al.*, 2007).

Recientemente, se ha publicado un estudio sobre ratones transgénicos con una sobreexpresión de GH bovina en los que se ha apreciado que esta sobreexpresión produce obesidad inducida por hiperfagia, lo que indicaría que la hormona del crecimiento tiene un efecto dual: produciendo por un lado la estimulación a nivel central del apetito y generando, por otro, un efecto lipolítico periférico (Bohloly *et al.*, 2005).

3.3.3. ACCIONES DE LA GH SOBRE EL HUESO

3.3.3.1. *Efectos de la GH sobre el crecimiento longitudinal óseo*

A. La GH y la regulación del crecimiento óseo longitudinal postnatal

Durante el proceso de crecimiento longitudinal del hueso, los precondrocitos de la capa celular germinal se diferencian y después sufren una expansión clonal limitada en columnas de condrocitos, en la placa de crecimiento. Como consecuencia de esto, las células de la zona hipertrófica maduran y degeneran, siendo incorporadas al hueso (Isaksson *et al.* 1987).

La GH es la hormona más importante en el crecimiento longitudinal óseo postnatal. Es más, se ha demostrado que la GH estimula el crecimiento del cartílago y otros tejidos más que por el aumento de tamaño de las células, por el incremento del número de éstas (Kember y Walker, 1971).

Según la hipótesis inicial, la GH inducía el crecimiento óseo mediante la estimulación hepática de IGF-I (también llamado factor de sulfatación) y este factor era el que en definitiva estimulaba el crecimiento longitudinal del hueso de forma endocrina (Daughaday y Rotwein, 1989). Pero al comienzo de los ochenta, esta hipótesis cambió gracias a un estudio llevado a cabo en ratas a las que se les inyectó GH directamente en la tibia, comprobándose que esta hormona estimulaba el crecimiento longitudinal de la placa de crecimiento en el lugar de la inyección (Isaksson *et al.*, 1982). Esta observación inicial se ha confirmado y extendido posteriormente, y actualmente está perfectamente documentado que la GH estimula directamente el crecimiento de muchos tejidos (Kassem *et al.*, 1993; Russell y Spencer 1985; Barnard *et al.*, 1991; Isgard *et al.*, 1986; Lewison *et al.*, 1993; Maor *et al.*, 1989, Stracke *et al.*, 1984).

Al estudiar los efectos de GH e IGF-I en preadipocitos 3T3, Green y colaboradores (1985) descubrieron que GH e IGF-I actuaban en diferentes estadios de maduración; la GH estimulaba los preadipocitos jóvenes, mientras que el IGF-I estimulaba células en un estadio de desarrollo posterior. A este efecto lo llamaron “teoría del efector dual” (*dual effector theory*). En consecuencia, los investigadores pensaron que esta teoría también podría aplicarse al tejido óseo (Isaksson *et al*, 1987). Se llevaron a cabo una serie de estudios *in vitro* usando cultivos de condrocitos de epífisis, y se observó que la GH estimulaba la formación de colonias de precondrocitos, mientras que IGF-I estimulaba células en un estado de maduración más avanzado y la GH interactuaba con las células progenitoras de los osteoblastos (Kassem *et al*, 1994).

B. Papel fisiológico del IGF-I en el crecimiento óseo.

Los estudios desarrollados en los últimos 30 años en animales y hombres GH-deficientes relacionados con la administración sistémica de IGF-I demuestran la capacidad de IGF-I y GH para estimular el crecimiento longitudinal óseo *in vivo* (Doga *et al.*, 2005; Gibney *et al.*, 1999; Johannsson *et al.*, 1997; Degerblad *et al.*, 1995; Sarnat H *et al*, 1988; Guler *et al.*, 1988; Holder *et al.*, 1981), así como el papel crítico que juegan el IGF-I y su receptor, en el correcto desarrollo normal del crecimiento y de los tejidos. La administración sistémica de IGF-I recombinante estimula tanto el crecimiento longitudinal óseo como la ganancia de peso en ratas hipofisectomizadas (Kidder *et al*, 1997; Guler *et al.*, 1988; Russell y Spencer, 1985; Holder *et al.*, 1981). Todos estos datos muestran que la liberación sistémica de IGF-I tiene la capacidad de incrementar el crecimiento en animales.

C. Evaluación de la Teoría de la somatomedina vs. la Teoría del efector dual

La administración sistémica de GH e IGF a ratas hipofisectomizadas ha demostrado que estas dos hormonas tienen funciones independientes y diferentes (Holder *et al.*, 1981; Fielder *et al.*, 1996). Cuando se suministran a la vez, sus efectos son sinérgicos; sin embargo, la sobre-expresión de GH (pero no la de IGF-I) produce crecimiento supranormal en ratones transgénicos (Behringer *et al.*, 1990). Por otro lado, la administración local de GH (pero no de IGF-I) produce un aumento de la producción local de IGF mediante la estimulación de la transcripción del gen de IGF-I (Isgaard *et al.*, 1986). Por tanto, se observa que hay una interrelación entre ambos factores.

Al administrar anticuerpos anti-IGF-I, se inhibe el efecto estimulador de la GH que ha sido aplicada de forma local, apoyando la teoría de que el IGF-I producido localmente tiene un papel muy importante en la expresión del efecto de la GH en el tejido de aplicación (Isaksson *et al.*, 1987).

El tratamiento con IGF-I es muy efectivo en el síndrome de insensibilidad a GH (GHIS) para aumentar el crecimiento en estatura durante 1 ó 2 años (apoyando así la teoría de la somatomedina), pero el efecto va disminuyendo, quizá debido a una tasa menor de estimulación de precondrocitos por un déficit de IGFBP-3 inducida por GH y/o por una administración de IGF-I sub-óptima (Backeljauw y Underwood, 2001; 1996).

La cuestión de si el IGF-I autocrino/paracrino o endocrino es el factor más importante en la estimulación del crecimiento tisular no se podrá resolver probablemente hasta que se puedan desarrollar estudios en animales transgénicos con delecciones génicas específicas para IGF-I o para su receptor.

Con los datos disponibles podemos afirmar que la GH estimula el crecimiento longitudinal de forma directa mediante la estimulación de los precondrocitos en la placa de crecimiento, seguido de una expansión clonal causada tanto por la producción local de

IGF-I inducido por GH, como por el aumento en los niveles circulantes de IGF inducidos por GH. La GH es el determinante más importante para producir la estimulación de las células progenitoras, aunque es posible que IGF-I pueda estimular de alguna manera también la célula progenitora.

3.3.3.2. *Efectos de GH in vitro*

Los **cultivos de tejido óseo**, si los comparamos con los sistemas de células aisladas, ofrecen la ventaja de que preservan las interacciones intercelulares, por tanto, se presenta un experimento más parecido a una situación *in vivo*.

La aplicación de GH a distintos cultivos de tejido óseo *in vitro*, ha demostrado que la hormona del crecimiento:

- Induce directamente la formación de hueso (Maor *et al.*, 1989),
- Estimula la producción de IGF-I (Maor *et al.*, 1989),
- Incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina (Stracke *et al.*, 1984),
- Eleva la síntesis de DNA (Maor *et al.*, 1989), y
- Aumenta el tamaño del cartílago (Maor *et al.*, 1989).

La GH estimula la proliferación de los **osteoblastos** (Kassem *et al.*, 1993, 1994; Kassem 1997; Sloatweg *et al.*, 1988, 1997) y a veces las funciones diferenciales de estas células, tales como la fosfatasa alcalina, osteocalcina, y el colágeno tipo I. Interactúa con las células progenitoras, al igual que ocurre en el caso de los progenitores de células de tejido adiposo y cartílago (Kassem *et al.*, 1994). La GH induce la expresión de IGF-I (efecto anabólico) en osteoblastos de roedores (Canalis *et al.*, 1989; Mohan y Baylink, 1991), pero no está clara esta inducción en los osteoblastos humanos (Chenu *et al.*, 1990; Kassem *et al.*, 1993).

Se sabe que el tratamiento con GH eleva los niveles séricos de IGFBP-3 (Holloway *et al.*, 1994) y aumenta la producción de IGFBP-3 en osteoblastos de rata (Ernst y Rodan,

1990; McCarthy *et al.*, 1994), pero no en los humanos (Canalis *et al.*, 1989); disminuye la producción de IGFBP-4 en osteoblastos tanto humanos como de rata (Mohan *et al.*, 1995) y aumenta los niveles de IGFBP-5 mRNA en los osteoblastos primarios de rata (McCarthy *et al.*, 1994). Parece que algunos de los efectos de GH sobre los osteoblastos están mediados por IGF, pero otros no.

Efectos de la GH sobre los osteoclastos

Se sabe que la GH eleva el número de osteoclastos en el hueso metafisario de tibia de rata hipofisectomizada (Lewinson *et al.*, 1993) que estimula la reabsorción ósea osteoclástica a través de la acción directa e indirecta sobre la diferenciación osteoclástica, y de forma indirecta sobre la activación de los osteoclastos maduros (Nishiyama *et al.*, 1996) y vía IGF-I e IL-6, sobre la formación osteoclástica (Stracke *et al.*, 1984; Nishiyama *et al.*, 1996; Saggese *et al.*, 1995, Mochizuki *et al.*, 1992, Jilka *et al.*, 1992).

3.3.3.3. Efectos de la GH sobre el metabolismo óseo en animales

Los modelos animales *in vivo* son útiles para evaluar la influencia del tratamiento con GH sobre los cambios en la masa, el metabolismo óseo y la resistencia mecánica del hueso. Estos modelos son excelentes para el estudio histológico ya que es posible realizar la histomorfometría estática y dinámica, así como evaluar diferencias en la respuesta de distintas zonas o regiones.

La administración sistémica de GH incrementa los niveles circulantes de otras hormonas que tienen influencia sobre el hueso, tales como el IGF-I y el metabolito activo de la vitamina D: 1,25-(OH)₂D₃ (Goff *et al.*, 1990). Hasta ahora, la administración sistémica de GH se ha utilizado en casi todos los modelos experimentales, y ha sido imposible dilucidar si las diferencias encontradas en las medidas están causadas por la

estimulación local o sistémica (vía IGF-I circulante) de la GH. Se han detectado receptores de GH, GHRs, en osteoblastos de epífisis de fémur y en calota de rata, utilizando técnicas inmunorreactivas y de mRNA (Morel *et al.*, 1993). Se ha estudiado el efecto de la liberación local de GH sobre el hueso en ratas, y se han demostrado los efectos de la expresión local de GH en tejido óseo en ratones transgénicos para GH. Varios estudios *in vivo* han mostrado que la GH es capaz de estimular la formación ósea mediante la interacción directa con el hueso (Hedner *et al.*, 1996; Saban *et al.*, 1996).

A. Efectos de la diferenciación y del tratamiento con GH sobre el hueso.

En ratas enanas (*dwarf*) dw/dw, que presentaban una función pituitaria normal exceptuando una deficiencia de GH, se encontró una disminución en la densidad DMO y un aumento en la AP sérica (Wright *et al.*, 1995b), así como un aumento en la formación de hueso perióstico, un incremento en la deposición de colágeno y una ligera disminución de la DMO (Martínez *et al.*, 1996).

En general, la administración de GH aumenta la formación y la masa ósea en animales con GHD.

B. Efectos del tratamiento con GH en los parámetros óseos de animales con secreción normal de GH.

Las ratas normales se han utilizado en muchas ocasiones para estudiar la influencia de la GH sobre el hueso intacto y los experimentos se han desarrollado en ratas jóvenes, adultas y viejas. Sin embargo, en casi todos estos estudios, la administración de GH ha provocado un crecimiento óseo lineal, porque las placas de crecimiento no se cierran hasta que las ratas son muy viejas. Por tanto, los datos obtenidos hay que evaluarlos en relación con el crecimiento, con el modelado y el remodelado óseos. Estos patrones de respuesta en

ratas deberían compararse con la situación obtenida en los primates (monos, humanos), ya que en éstos, las placas de crecimiento se cierran tras la maduración sexual.

En **ratas** se incrementa la masa ósea cortical mediante la inducción de la formación ósea subperióstica y se produce un incremento de la resistencia mecánica de todo el hueso (Jorgensen *et al*, 1991; Andreassen *et al*, 1995); ganan peso y se evidencia un aumento del *turn over* óseo (Turner, 1995).

En los **ratones gigantes GH-transgénicos** donde el promotor era la osteocalcina, la GH se expresaba en los osteoblastos, y se demostró mayor crecimiento en el fémur, aumento del grosor o anchura cortical y un incremento de la fuerza mecánica (Tseng *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1992), pero la calidad de hueso había disminuido.

El metabolismo de los **primates** es más parecido al humano, por eso se han utilizado en diversos trabajos. En monas viejas se demostró que la administración de GH incrementaba la formación ósea medida por el depósito mineral y las tasas de formación ósea en huesos (Sass *et al.*, 1997).

La terapia con GH en **animales ovariectomizados (OVX)** estimula la masa cortical ósea induciendo la formación de hueso subperióstico, produciéndose un incremento del volumen óseo, del ratio superficie/volumen y de las superficies de mineralización osteoide y de osteoclastos (Andreassen y Oxlund, 1996). Además se eleva la fuerza o resistencia mecánica de los cuerpos vertebrales directamente relacionada con el aumento de masa ósea (Andreassen y Oxlund, 1996; Eschen y Anddreassen, 1995).

En **animales tratados con glucocorticoides**, los tratamientos a largo plazo con GH no parecen contrarrestar el efecto adverso de los glucocorticoides sobre el crecimiento

lineal, la formación de hueso y la masa ósea, aunque la GH por sí sola puede elevar estos parámetros (Ortoft y Oxlund, 1996).

C. Efectos de la GH en la curación de fracturas

Obviamente, la terapia con GH en ratas (Bak *et al.*, 1990; Bak y Andreassen, 1991; Nielsen *et al.*, 1991) y en *minipigs* (Kolbeck *et al.*, 2003; Bail *et al.*, 2002) favorece la formación del callo óseo y la resistencia mecánica de los huesos en proceso de curación, mientras que en conejos (Brittberg *et al.*, 1997), la respuesta es mucho más débil.

3.3.3.4. Efectos de la GH en el metabolismo óseo en humanos

A. En pacientes con exceso o déficit de GH

La **acromegalia** es una rara enfermedad que está causada por una hipersecreción de GH y está fuertemente asociada con un aumento del *turn over* óseo en las etapas de actividad. Muchos estudios sugieren que el hueso cortical está aumentado en la acromegalia mientras que el trabecular no parece estar tan afectado (Bolanowski *et al.*, 2006; Bogazzi *et al.*, 2005; Slootweg 1993).

En **niños con deficiencia de GH**, se encuentra una osteopenia relativa antes de comenzar el tratamiento con GH, seguramente producida por un retraso en la maduración esquelética (Ono *et al.*, 1996; Kaufman *et al.*, 1992). Diversos trabajos han mostrado que en adultos con GHD de comienzo infantil, existe baja masa ósea (Van de Weghe *et al.*, 1993; Bravenboer *et al.*, 1997; Kaufman *et al.*, 1992) así como una disminución en el CMO y en el área de densidad mineral ósea (CMO/ área ósea), en la espina dorsal y en la cadera no dominante. También se ha observado una relación positiva entre la altura y el área de DMO. Resultados similares se han obtenido en pacientes con deficiencias

pituitarias múltiples y GHD aislada, lo que sugiere que la falta de GH es el factor más importante en la baja masa ósea observada en la GHD establecida en la infancia (Kaufman *et al.*, 1992).

No hay datos que sugieran que se produce un aumento de pérdida de hueso tras cesar el tratamiento con GH en adultos jóvenes (Kaufman *et al.*, 1992). Por eso, se podría pensar que el no adquirir la suficiente masa ósea durante la infancia, y en consecuencia, tener un pico menor de la misma, explicaría la disminución en CMO y DMO en estos pacientes. Por el momento, no hay trabajos que muestren que el tratamiento con GH durante la infancia dé como resultado la normalización en el DMO cuando se alcanza el pico óseo, sugiriendo que la GH también es importante en el incremento de hueso adicional que sucede tras completar el crecimiento lineal. El tratamiento con la hormona debería continuarse hasta alcanzar el pico de masa ósea, sin tener en cuenta la altura alcanzada.

En diversos trabajos se ha encontrado un aumento de la prevalencia de osteoporosis en **pacientes con GHD adquirida en la edad adulta** (Johansson *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1993; Degerblad *et al.*, 1995). La densidad mineral ósea total medida mediante DEXA disminuye (Johansson *et al.*, 1992), así como el CMO (Rosen *et al.*, 1993), éste último en pacientes menores de 55 años. Es interesante el hecho de que los adultos viejos tienen menor disminución de masa ósea que los adultos jóvenes.

Se sugiere la existencia de **mayor riesgo de fractura** vertebral osteoporótica en pacientes con hipopituitarismo. Rosen *et al.* (1993, 1997) encontraron una tasa de 2 a 3 veces superior en pacientes con GHD comparado con los controles sanos, (una submuestra del estudio WHO MONICA de Goteborg).

Durante el **tratamiento con GH de las personas que padecen GHD** se produce un incremento dosis dependiente de los marcadores de reabsorción y formación óseos, que es máximo tras 3 y 6 meses respectivamente (Hansen *et al.*, 1996; Johannsson *et al.*, 1996 b). Tras dos años de tratamiento, la tasa elevada de remodelado óseo se mantiene (Johannsson *et al.*, 1996 b). En un trabajo realizado sobre varones con GHD (Bravenboer *et al.*, 1997) se hizo evidente un aumento del *turn over* óseo y un incremento del espesor cortical. El *turn over* óseo puede permanecer elevado durante muchos años como resultado de la presencia de altos niveles de GH en plasma (Kotzmann *et al.*, 1993). La GH debe elevar la actividad de la 1 α -hidroxilasa, elevando por tanto la concentración o la disponibilidad (Lieberman *et al.*, 1994) de la vitamina D₃, lo que, posiblemente, se convierte en el mecanismo por el que se produce el incremento sostenido de las concentraciones cálcicas. Una hipótesis alternativa sería que se produce una mayor movilización del calcio esquelético debido al aumento del *turn over* óseo.

En los tratamientos a corto plazo (6-18 meses) en niños con GHD, no se observa un aumento significativo de DMO ni de CMO (Whitehead *et al.*, 1992; Balducci *et al.*, 1995), incluso se aprecia disminución marcada de estos parámetros (Thoren *et al.*, 1993). Por el contrario, en los experimentos a largo plazo (12-30 meses), los resultados son más esperanzadores (O'Halloran *et al.*, 1993; Degerblad *et al.*, 1992). En la GHD establecida en la edad adulta, los resultados a corto plazo son similares (Beshyah *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1995; Degerblad *et al.*, 1995) y a largo plazo se observa un incremento significativo de DMO en espina lumbar y cuello femoral (Baum *et al.*, 1996).

Puesto que la absorciometría ósea sólo detecta el componente mineral del hueso, la reducción en la densidad observada tras periodos cortos de tratamiento con la hormona se puede explicar por el aumento de la actividad remodeladora, donde se produce mayor

espacio de remodelación y un aumento de proporción del hueso nuevo sin mineralizar (Johannsson *et al.*, 1996b).

También se han observado diferencias en la respuesta de los distintos sexos a los tratamientos con GH, de tal forma que la interacción entre GH y estrógenos induce un balance de remodelado más positivo y con menor incremento en la actividad remodeladora ósea comparada con la interacción entre GH y andrógenos (Johannsson *et al.*, 1996 b).

Efectos de la GH sobre la vejez : Los artículos publicados no han mostrado un efecto muy marcado de la GH sobre la masa ósea (Rudman *et al.*, 1990; Holloway *et al.*, 1994; Marcus *et al.*, 1990), sin embargo y puesto que el efecto positivo de esta hormona sobre la masa ósea en pacientes con GHD no se hace evidente hasta los 18 meses de tratamiento, serían necesarios más trabajos para conocer exactamente si la terapia es efectiva o no sobre la masa ósea de los pacientes mayores antes de llegar a establecer conclusiones.

B. Efectos del eje GH/IGF-I en el metabolismo óseo y en la masa ósea en pacientes con secreción normal de GH

B1 Osteoporosis

Las causas de la osteoporosis son complejas y multifactoriales. La masa ósea disminuye con la edad, pero los mecanismos por los que se produce todavía no se han esclarecido completamente. El aumento de edad está asociado con una disminución de la secreción de GH y de la concentración sérica de IGF-I (Brixen *et al.*, 1993; Jeffcoat *et al.*, 1993). Estos resultados indican que el eje GH/IGF-I también puede estar implicado en la patofisiología de la osteoporosis postmenopáusica y se debería tener en cuenta en el tratamiento de estos pacientes.

Por otro lado, la terapia a largo plazo con GH en el sd. de Turner resulta en un estado mineral óseo normal (Lanes *et al.*, 1995).

B2 Osteoporosis inducida por corticoides

Esta dolencia se caracteriza por una disminución de la formación ósea junto con un incremento en la reabsorción. El tratamiento con GH durante 7 días en pacientes con consumo crónico de glucocorticoides resulta en un aumento significativo de las concentraciones séricas de osteocalcina, PICP y CITP (Giustina *et al.*, 1995), pero son necesarios más estudios a largo plazo.

B3 Efecto de IGF-I

Se ha observado que bajas dosis de IGF-I son capaces de estimular de forma independiente la formación ósea sin inducir reabsorción (Ghiron *et al.*, 1995). Al comparar los efectos terapéuticos de GH e IGF-I se observó que los resultados eran muy similares, aunque el PICP se elevaba más con IGF-I (Johansson *et al.*, 1996 a). Estos datos sugieren un nuevo uso del IGF-I para estimular de forma selectiva la formación en estados de desnutrición y bajo *turn over* óseo, pero no está claro si IGF-I tiene también la capacidad de incrementar la masa ósea en humanos.

C. Curación de fracturas

El tratamiento con GH acelera la curación de las fracturas cerradas de forma estadísticamente significativa (frente a placebo), reduciendo el tiempo de curación aproximadamente un 26 %, sin embargo, no existen diferencias significativas cuando se trata de fracturas abiertas y cerradas tomadas en conjunto (Raschke *et al.*, 2007). Por otro lado, puesto que el eje GH/IGF-I tiene efectos muy marcados sobre la regulación local y

sistémica del metabolismo óseo, puede ser muy importante en la calidad del proceso de curación de las fracturas, de hecho, una alteración en este eje puede estar implicada en los mecanismo bioquímicos que determinan el retraso o el fracaso de la curación de fracturas (Weiss *et al.*, 2007).

Por el momento, no es posible evaluar si el tiene alguna relevancia en la curación de fracturas en humanos ya que se han llevado a cabo muy pocos experimentos.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1. MATERIAL

4.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

4.1.1.1. *Fase de osteoporosis experimental*

Se utilizaron veinticinco conejas sanas pertenecientes a la raza *New Zealand White*, con un peso entre 4 y 4,5 kg. A lo largo del proceso experimental, los animales permanecieron en celdas individuales y en un ambiente estable de 22- 24°C, humedad del 55-70%, ventilación de 15 renovaciones por hora y un ritmo de luz circadiano de 12 horas. Antes de la ovariectomía, los animales fueron alimentados con la dieta estándar de laboratorio (Panlab SL), y tras la ovariectomía se les suministró una dieta pobre en calcio (Nutrient Requeriments of Rabbits, 1997) (Tabla XII); recibieron agua *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité Local de Ética para el Uso de Animales de la UCM.

4.1.1.2. *Fase de colocación de implantes y aplicación de GH*

Para este trabajo, se utilizaron dieciséis conejas sanas de la raza *New Zealand White*, con pesos comprendidos entre los 4 y los 5kg. Las condiciones de estabulación fueron las mismas que las mencionadas en el apartado anterior. El grupo control (NO-OVX) fue alimentado con la dieta estándar de laboratorio (Panlab SL) y al grupo de conejas ovariectomizadas (OVX) se les suministró una dieta pobre en calcio (Nutrient Requeriments of Rabbits, 1997) (Tabla XII); ambos grupos recibieron agua *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité Local de Ética para el Uso de Animales de la UCM.

4.1.2. MATERIAL QUIRÚRGICO

Se utilizó el instrumental propio de las intervenciones quirúrgicas e implantológicas, así como ketamina (Imalgene 1000®) y xilacina (Rompún 2%®) como material de anestesia.

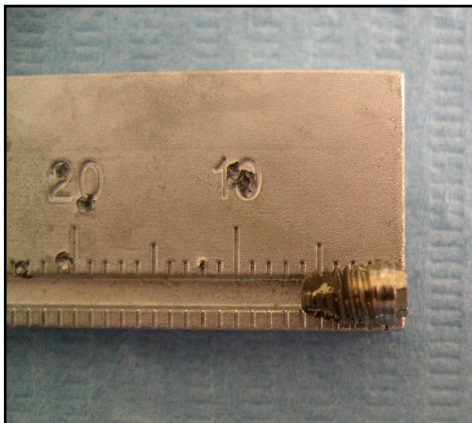
4.1.3. MATERIAL PARA LA DENSITOMETRÍA

Se utilizó el densitómetro NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) (Fig. 8) en el modo investigación. Las imágenes obtenidas se almacenaron en un ordenador personal y se procesaron mediante el *software* que acompaña al densitómetro.

4.1.4. MATERIAL DE EXPERIMENTACIÓN

4.1.4.1. *Implantes*

Se colocaron implantes roscados de titanio puro con superficie tratada de la casa B&W ®, de 6 mm de longitud, con 2'5 mm de diámetro en la rosca y 3'3 mm de diámetro en la cabeza del implante, con hexágono externo (Figs. 13 y 14).



Figuras 13. Implante utilizado en el estudio.



Fig 14. Implante B&W

4.1.4.2. *Hormona del crecimiento*

Se utilizó hormona del crecimiento recombinante humana liofilizada-particulada (Saizen ®, Laboratorios Serono, Madrid, España), 2 U.I. por cada lecho implantario.

4.1.5. MATERIAL HISTOLÓGICO

Se diseccionaron las tibias y se sumergieron en una solución tamponada a pH 7 de formaldehído al 10%. Se eligió la parte proximal de las tibias, donde estaba situado el implante, para incluir estas muestras en metacrilato (GMA y T-7200®), en concentraciones crecientes y durante 2 meses, con el fin de que toda la muestra se incluyera correctamente en esta sustancia. Posteriormente se polimerizaron durante 8 horas (dos horas en luz blanca y seis en luz azul) con una lámpara de luz ultravioleta Exakt® hasta conseguir un bloque homogéneo (Fig. 15).

Cada bloque de metacrilato fue montado y cortado sucesivamente con el microtomo Exakt® y pulido con la pulidora Exakt® hasta conseguir cinco o seis preparaciones de cada espécimen de aproximadamente 70μ, susceptibles de ser teñidas, con tricrómico de Masson, Sirius, Azul Alcían, Azul de Toluidina, y Hematoxilina Weigert - Eosina,

siguiendo el protocolo del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid). Las preparaciones se analizaron mediante microscopio óptico.

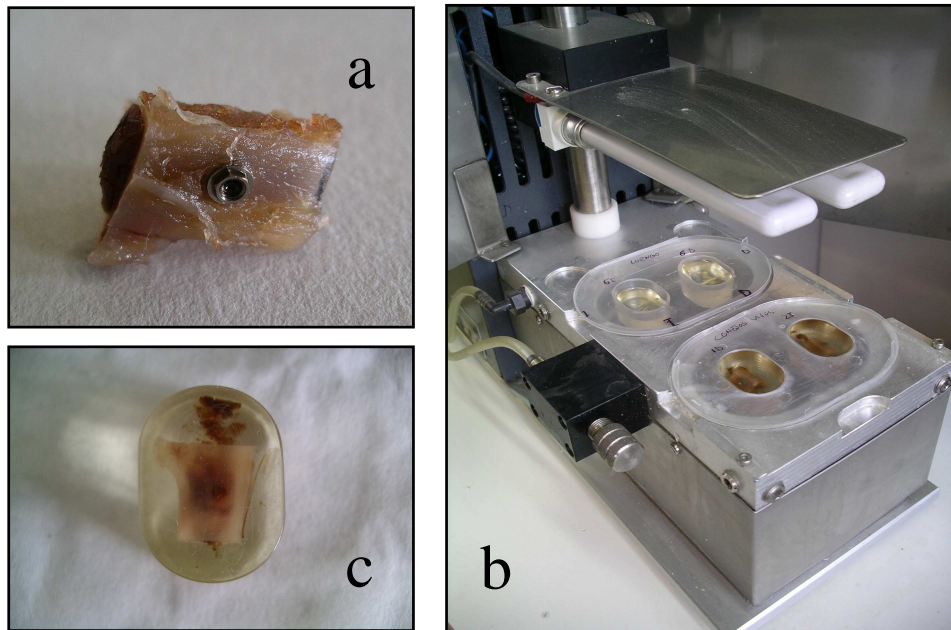


Figura 15. (a) Porción proximal de tibia donde se aloja el implante, (b) lámpara de polimerización Exakt ®, (c) bloque de metacrilato polimerizado.

4.2. *METODOLOGÍA*

4.2.1. METODOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL

En este estudio, la osteoporosis experimental en conejas se pretende conseguir mediante la ovariectomía más administración de dieta hipocálcica. Para evaluar la efectividad del método, se realizaron mediciones de DMO (densitometrías) *in vivo* antes y después de la ovariectomía y la dieta hipocálcica.

4.2.1.1. *Animales de experimentación*

Para la realización de la densitometría, las 25 conejas se anestesiaron mediante una inyección de 0'75 mg/kg de ketamina intramuscular (Imalgene 1000®) más 0'25 mg/kg de xylazine (Rompún 2%®) (Weisbroth and Fudens, 1972; Green y *et al*, 1981).

4.2.1.2. *Medición de la densidad mineral ósea mediante el análisis con absorciometría dual fotónica (DEXA).*

El análisis DEXA se llevó a cabo en un densitómetro NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) en el modo investigación en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid). Para determinar el coeficiente de variación intrínseco del aparato, se escaneó diariamente un fantomas de columna diseñado específicamente para la máquina, previo a las densitometrías (Fig. 8).

Todas las conejas se colocaron centradas sobre la superficie de la camilla en la misma posición (decúbito prono), sobre un plástico primero y un papel secante de laboratorio en segundo lugar. Asimismo, se les cubrió la cabeza con un paño quirúrgico. Las extremidades se colocaron perfectamente estiradas y las orejas se fijaron a la mesa con cinta adhesiva a ambos lados de la calota (con el fin de no interferir con la medición de la densidad de la columna).

Mediante la opción de investigación que nos ofrece el *software* del densitómetro, se realizaron, en primer lugar, el estudio de la calota y la columna cervical. Se predeterminaron las zonas a explorar mediante un indicador de rayo láser rojo, marcando un primer punto de inicio en el hocico, un segundo o punto final a unos centímetros tras la salida de las patas delanteras y un 3^{er} punto base lateralmente al cuello y ventral a la salida de la pata delantera derecha. Se completó el estudio en un tiempo aproximado de 15 minutos.

Para el estudio de la tibia trasera derecha se colocó la extremidad perfectamente alineada con el eje longitudinal de la mesa. Las marcas de referencia fueron: la primera, a unos centímetros craneal a la articulación de la rodilla, un 2º punto distal al tobillo y un tercero base, lateral (por fuera y a la derecha) al punto medio de la longitud de la tibia. Este estudio se completó en un tiempo aproximado de 8 minutos.

Para todas las exploraciones y una vez marcados los puntos de referencia para definir la zona, se modificaron los parámetros prefijados por el densitómetro y se adaptaron para la opción de investigación, esto es: resolución de exploración y de medida: 1.0 x 1.0 y velocidad de exploración de 40 mm/seg.

Todas las pruebas densitométricas fueron realizadas por el mismo investigador. Se almacenaron las imágenes en el ordenador para su estudio ulterior. Se calculó la DMO (g/cm^2), el CMO (g) y el AREA (cm^2) de cada región (Fig. 16).

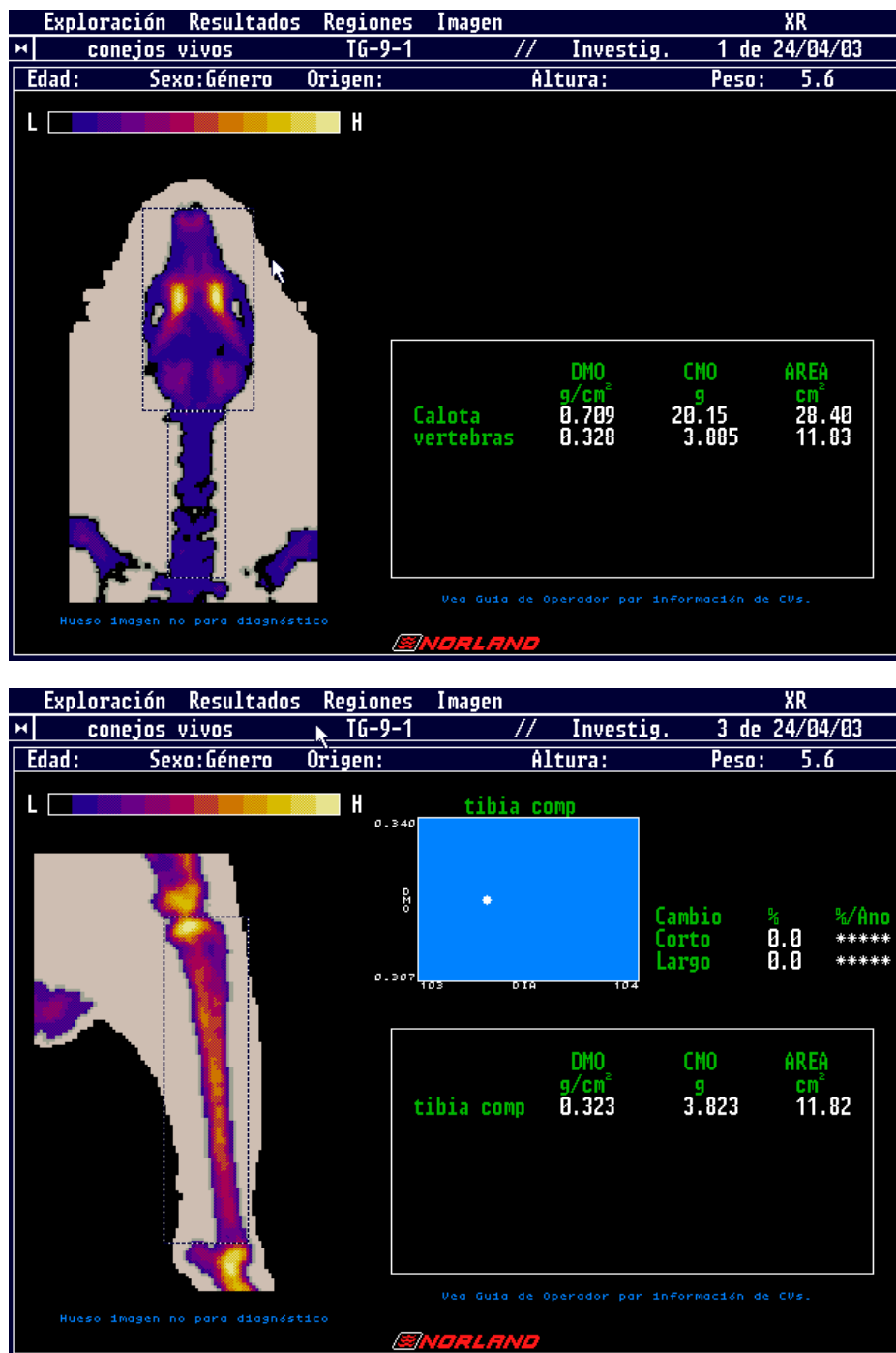


Fig 16. Imágenes del *software* que acompaña al densitómetro: (a) Densitometrías de calota y columna y (b) de tibia.

4.2.1.3. Fase de ovariectomía bilateral más dieta hipocálcica

A la semana, se sometió a los animales a una ovariectomía bilateral bajo anestesia general (inducida del modo ya descrito anteriormente). Antes de la cirugía, se rasuró la piel del abdomen y se limpió cuidadosamente con una solución yodada (Betadyne®) (Figs.17 y 18). Tras la cirugía, se prescribió antibioterapia oral (oxitetraciclina) y fueron alimentadas con la dieta estándar de laboratorio y agua *ad libitum* durante 1 semana. Tras este tiempo, se le suministró la dieta hipocálcica (tabla XII), durante 6 semanas.

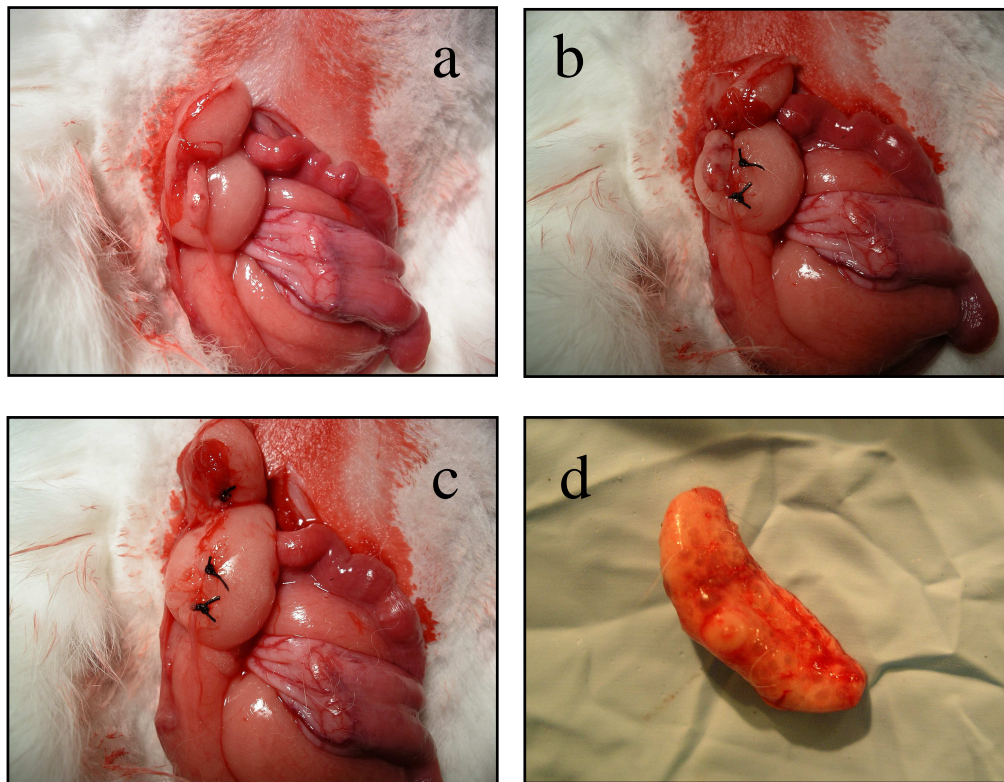


Figura 17. Secuencia de ovariectomía: (a) Localización del ovario, (b) puntos pasantes, (c) ovario extirpado, (d) detalle del ovario.

Tabla XII. Dieta pobre en calcio: 0,07 % Ca^2 vs. 0,45 % Ca^2 de la dieta estándar del conejo (Nutrient Requirements of Rabbits 1977)	
NUTRIENTES	PORCENTAJE
Cebada	74,2 %
Salvado de trigo	20 %
Soja	5%
Sal	0,3 %
Corrector	0,5 %

Durante este periodo de tiempo, nueve de los animales fallecieron por diversas causas.

A las siete semanas de la ovariectomía, se volvieron a repetir las mediciones densitométricas siguiendo el procedimiento ya descrito anteriormente (Fig. 18).

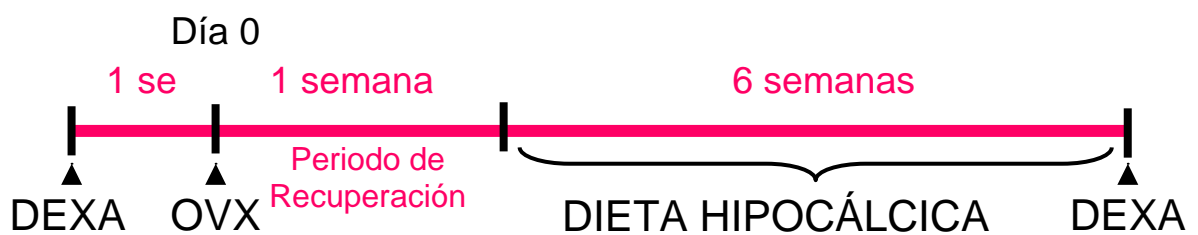


Fig. 18: Esquema de tiempos en la fase de osteoporosis experimental.

4.2.1.4. Tratamiento estadístico de los resultados

Para finalizar se procedió a la elaboración de los resultados y al análisis estadístico de los mismos, mediante la aplicación del test de MUESTRAS PAREADAS con el programa informático StatGraphics® 5.0. Los datos se expresaron en medias \pm desviación estándar y se consideró estadísticamente significativo una $P < 0.05$. Se compararon fundamentalmente las DMOs de las distintas regiones de estudio, antes y después de la ovariectomía más dieta hipocálcica. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (R) para establecer la correlación entre las diferencias de DMO antes y después de la OVX+DIETA entre los distintos grupos.

4.2.2. METODOLOGÍA DE LA FASE COLOCACIÓN DE IMPLANTES Y GH

4.2.2.1. Fase de osteoporosis experimental

Las 16 conejas se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos; a ocho de las conejas se les practicó la ovariectomía bilateral bajo anestesia general (grupo OVX) y se les suministró la dieta hipocálcica (tabla XII), mientras que las ocho restantes pasaron a formar el grupo de animales intactos (INTACTO) (Fig. 19). La anestesia general se indujo con una inyección de 0'75 mg/kg de ketamina intramuscular (Imalgene 1000®) más 0'25 mg/kg de xylazine (Rompún 2%®) (Weisbroth and Fudens, 1972; Green y *et al*, 1981).

4.2.2.2. Cirugía de colocación de los implantes

Seis semanas después, los animales fueron anestesiados, como ya se ha descrito anteriormente y se colocaron 32 implantes roscados de titanio en la cara medial de las tibias de las conejas por ser una zona libre de inserciones musculares (un implante por tibia, colocados aproximadamente un centímetro por debajo de la tuberosidad tibial anterior y monocorticales) (Fig. 20), todo ello en condiciones de asepsia. Para labrar los

lechos implantarios, se utilizaron fresas a baja velocidad (< 800 r.p.m.) y profusa irrigación con suero salino estéril. Posteriormente, los grupos OVX e INTACTO fueron subdivididos en 2 grupos, en función de la administración o no de la GH local.

En los grupos OVX-GH e INTACTO/GH, de 5 conejas cada uno, se administraron 2 U.I. de GH recombinante humana (rhGH) (Saizen ®, Laboratorios Serono, Madrid) en el interior del lecho óseo, justamente antes de la colocación del implante.

En los grupos OVX/CONTROL e INTACTO/CONTROL (de 3 conejas cada uno) no se colocó ninguna sustancia en la herida quirúrgica.

A las dos semanas de la cirugía de colocación de implantes, se sacrificó a los animales con una inyección de pentobarbital sódico IV a dosis letal.

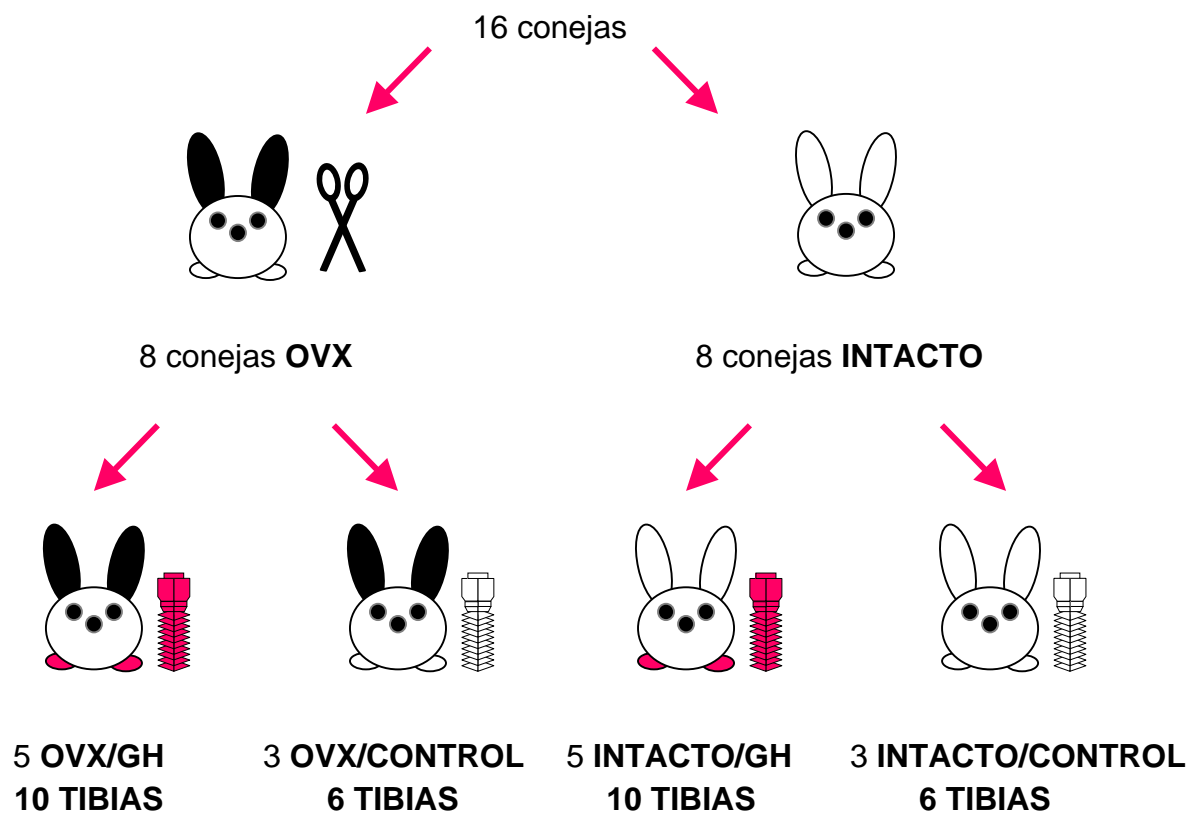


Fig. 19. Grupos experimentales.

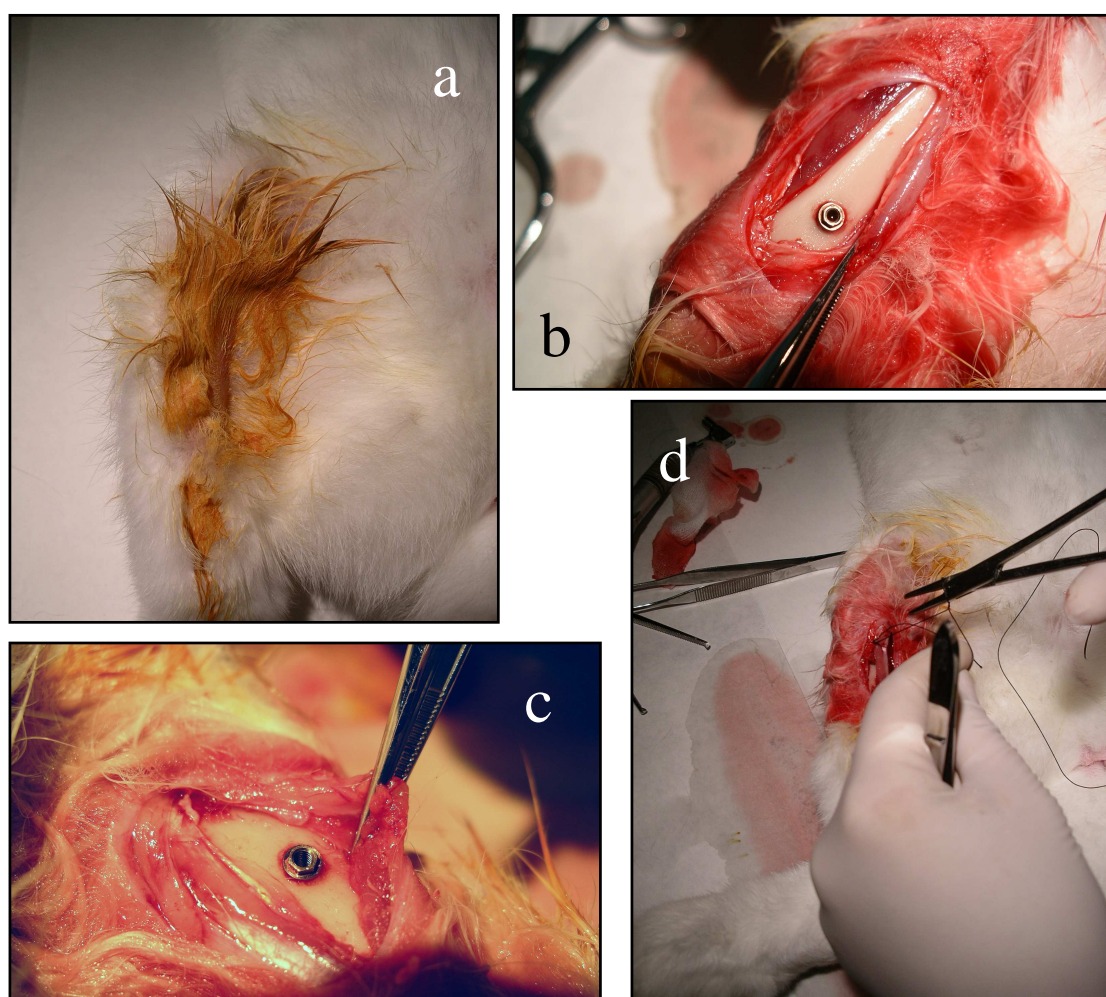


Figura 20. Secuencia cirugía de colocación de los implantes: (a) Aplicación de solución yodada, (b) y (c) Implante colocado en cara ántero-medial de la tibia, (d) Sutura por planos.

4.2.2.3. Medición de la Densidad Mineral Ósea mediante el análisis con absorciometría dual fotónica de rayos x (DEXA).

Se diseccionaron las tibias y se sumergieron en una solución de formaldehído al 10% tamponada a pH 7, para evitar la desnaturalización de las proteínas, almacenándolas en frigorífico hasta realizar el análisis densitométrico (DEXA).

La DMO se cuantificó en g/cm^2 . El análisis DEXA se llevó a cabo en un densitómetro NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) en el modo investigación; previamente se calibró el aparato. Todas las tibias se colocaron sobre la superficie de la camilla con su borde anterior hacia craneal, e intentando que el implante se situase lo más perpendicular posible al rayo incidente, para facilitarle al programa el análisis de las áreas (Fig. 22). Se procedió al estudio de cada tibia completa a una velocidad de 40 mm/s (con una resolución espacial de $1.0 \times 1.0 - 0.5 \times 0.5$) y se almacenaron las imágenes en el ordenador para su procesamiento ulterior. Este estudio llevó aproximadamente 15 minutos por tibia. Se seleccionaron siete regiones de interés de cada imagen almacenada, a saber: "TOTAL", "1/3", "1/9", "LATERAL", "IMPLANTE", "SUMA", y "ALREDEDOR" (Fig. 21) y el programa proporcionó los valores de DMO, CMO y ÁREA de cada una de ellas. Este estudio se realizó en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid).

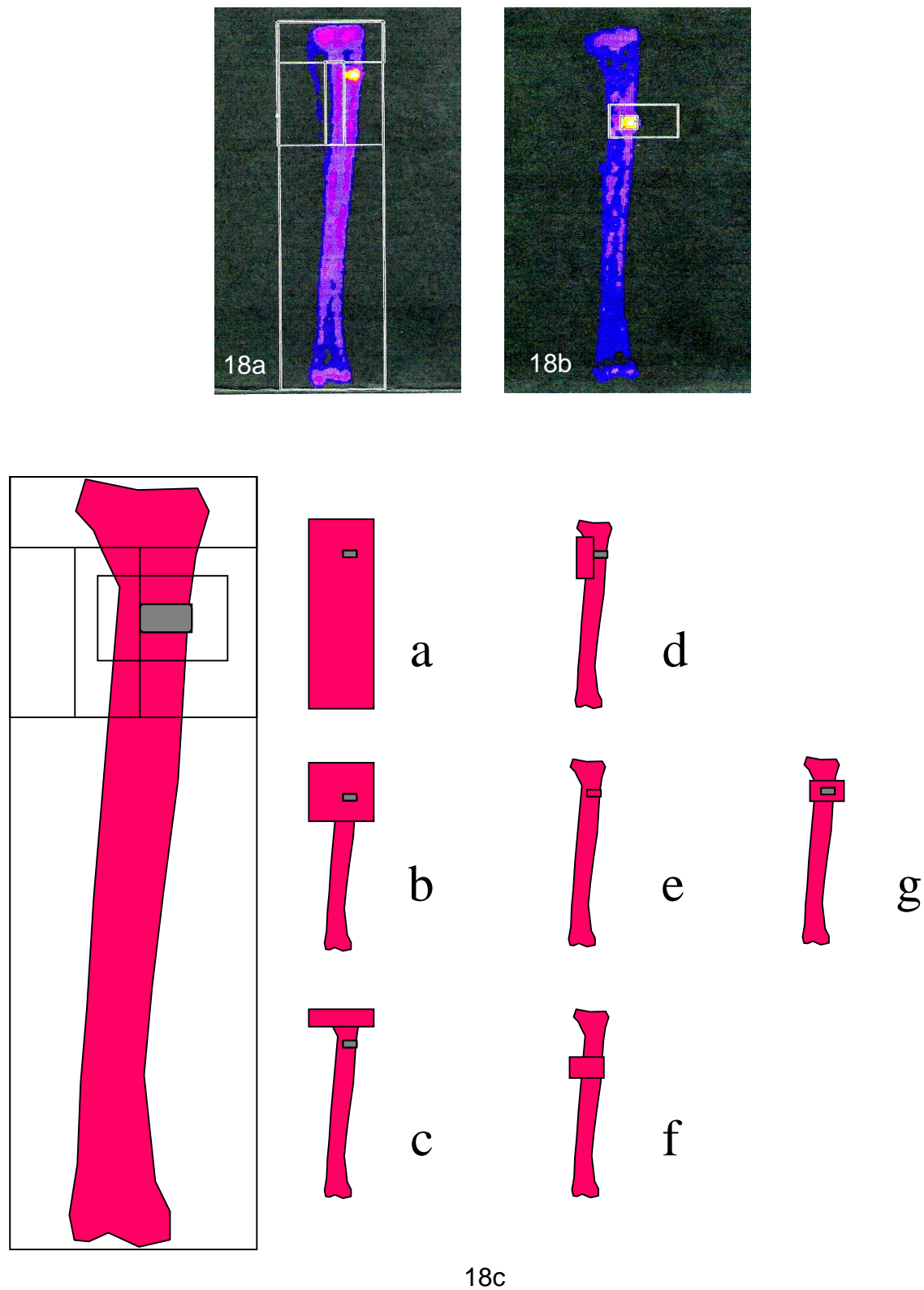


Figura 21. (18a) y (18b): Imágenes del *software* del densitómetro Norland donde se observan las regiones definidas sobre la tibia. (18c): Esquema de las regiones definidas para el análisis mediante DEXA: a) TOTAL, b) 1/3, c) 1/9, d) LATERAL, e) IMPLANTE, f) SUMA, g) ALREDEDOR

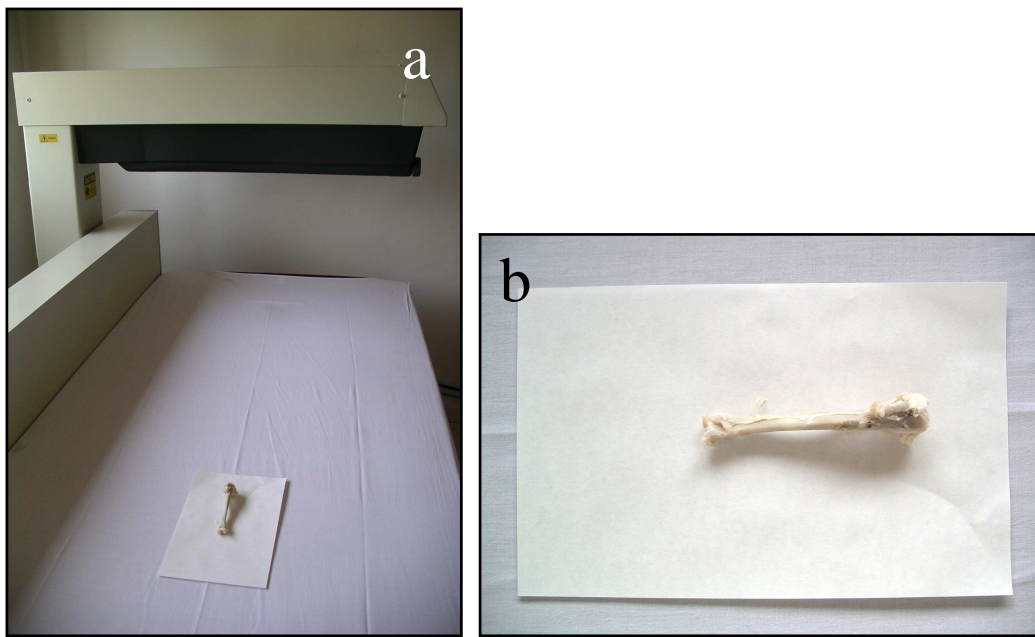


Figura 22: (a) Densitómetro Norland®, (b) detalle de la tibia colocada en la camilla con su borde anterior hacia arriba

4.2.2.4. Preparación de las muestras

Tras realizar el análisis DEXA, se eligió la parte proximal de las tibias, donde estaba situado el implante, para incluir estas muestras en 2-hidroxietilmetacrilato y en Tecnovit 7200®, en concentraciones crecientes y durante 2 meses, con el fin de que toda la muestra se incluyera correctamente (basado en el método de Donath y Breuner, 1982). Posteriormente se polimerizaron durante 8 horas (dos horas con luz blanca y seis con luz azul) utilizando una lámpara de luz ultravioleta (Exakt®) hasta conseguir un bloque homogéneo (Fig. 23).

Cada bloque de metacrilato de 2 cm de grosor fue montado y cortado sucesivamente con el microtomo Exakt® y pulido con la pulidora Exakt® hasta conseguir cinco o seis preparaciones de cada espécimen de aproximadamente 70 μ , susceptibles de ser teñidas, para su posterior estudio con microscopio óptico (Fig. 23).

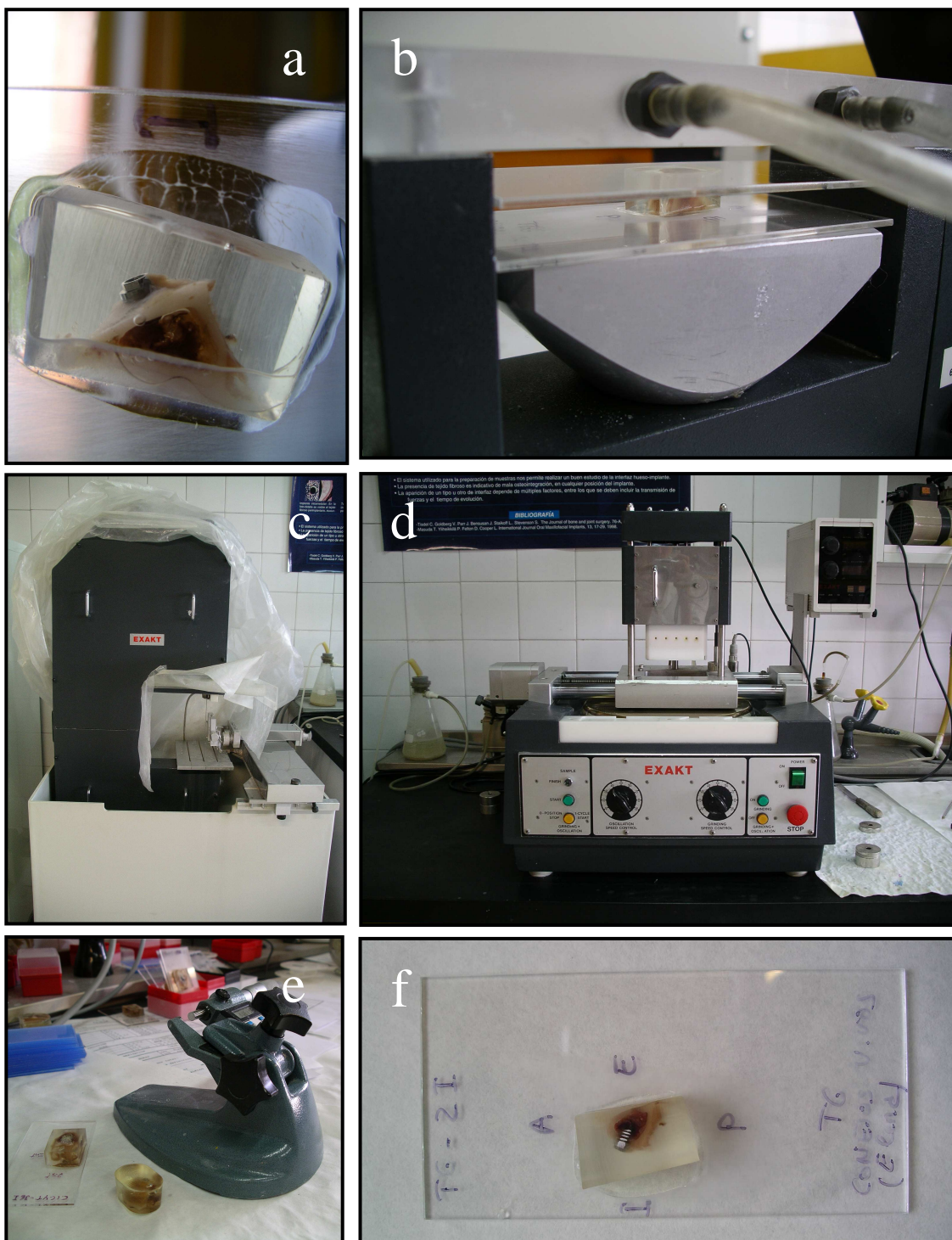


Figura 23. (a) Bloque de metacrilato ya cortado y montado en el portaobjetos, (b) Máquina de paralelizado de portaobjetos, (c) Recortadora Exakt®, (d) Pulidora Exakt®, (e) Calibradora, (f) Portaobjetos con muestra preparada para cortar.

4.2.2.5. *Análisis histomorfométrico*

A.1. Microscopía óptica

Se realizaron tinciones histológicas de Tricrómico de Masson, Azul de Toluidina, Azul Alcían, Hematoxilina-Eosina y Sirius, siguiendo el protocolo del Laboratorio de Anatomía Microscópica del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid).

Para el estudio de los proteoglicanos y las glicoproteínas presentes en el hueso se aplicaron las tinciones de Azul Alcían y Azul de Toluidina:

* *Azul Alcían*: sirve para determinar los mucopolisacáridos ácidos y pone de manifiesto la presencia de proteoglicanos ácidos sulfatados (se tiñen de azul y forman estrías) (Fig. 24).

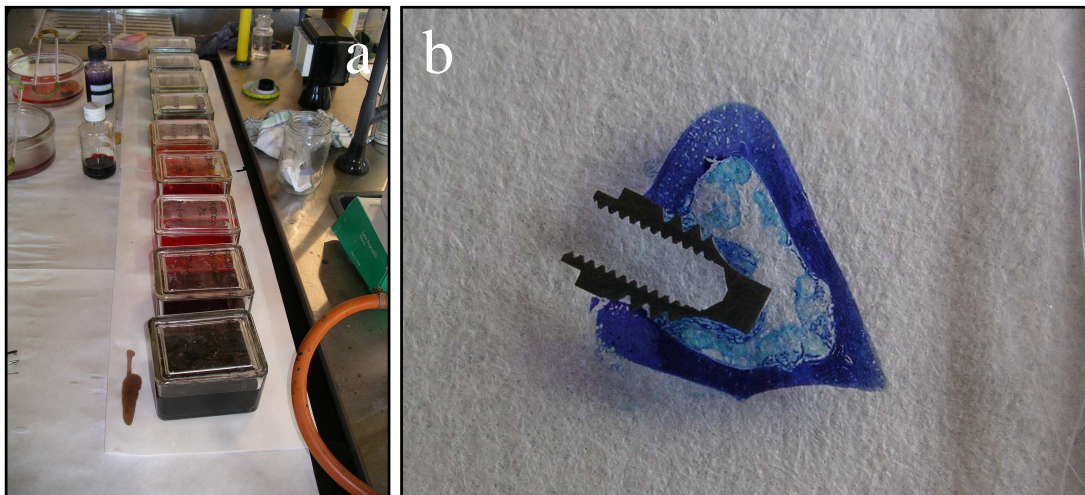


Figura 24. (a) Tintes utilizados en las preparaciones histológicas de Tricrómico de Masson, (b) Preparación histológica con tinción de Azul Alcían.

* *Reacción metacromática de azul de toluidina:* también se utiliza para demostrar la existencia de mucopolisacáridos ácidos, que se tiñen en rojo o púrpura, en contraste con el azul del resto, y sobre todo para observar las células óseas que se tiñen ortocromáticamente con una calidad superior a la obtenida con la técnica de hematoxilina-eosina (Fig. 25).

En otros métodos utilizados para estudiar diversos componentes del hueso no tiene lugar una reacción química, sino que la coloración se obtiene por mecanismos físicos o fisicoquímicos en los que intervienen factores tan diferentes como la densidad y/o la textura de las estructuras. Se utilizaron los siguientes:

* *Tinción de tricrómico de Masson:* sirve para la demostración de las fibras colágenas; permite diferenciar en verde el tejido óseo calcificado y en naranja-rojo el osteoide no calcificado. El conjuntivo se tiñe en rojo y los núcleos en azul negruzco (Figs. 24 y 25).

* *Tinción de Sirius (rojo sirio)* que, al polarizarse, permite ver la birrefringencia de las fibras de colágeno (Fig. 25).

* *Hematoxilina Weigertt - eosina,* proporciona una coloración de conjunto y permite diferenciar células, ya que la hematoxilina tiñe el núcleo y la eosina el citoplasma celular (Fig. 25).

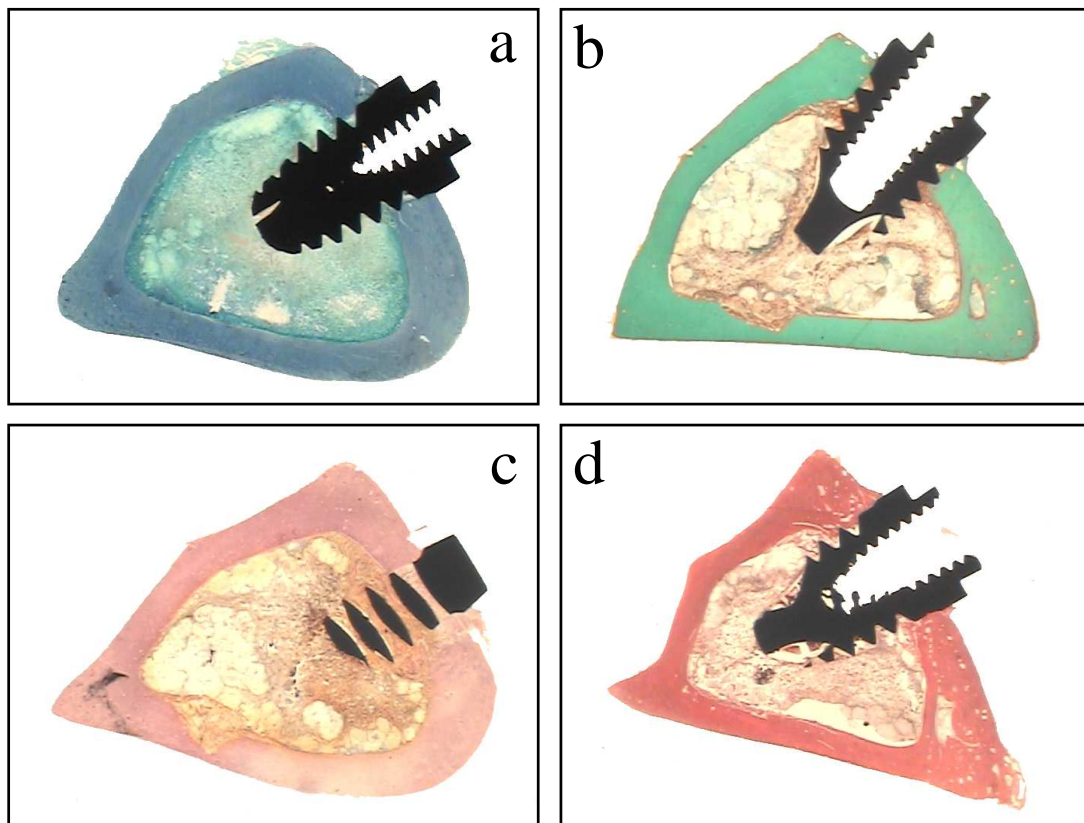


Figura 25. Tinciones: (a) Azul de Toluidina, (b) Tricrómico de Masson, (c) Rojo Sirius, (d) Hematoxilina Weigert-eosina

En el estudio histológico se han analizado los posibles cambios o modificaciones en toda la cortical del hueso, incluyendo endostio y periostio, la cortical que está siendo atravesada por el implante y la respuesta tisular alrededor del implante dentro de la cavidad medular.

A.2. Morfometría

Con el fin de cuantificar la reacción ósea periimplantaria, se llevó a cabo el estudio morfométrico, mediante el analizador de imágenes MIP-4, que es un sistema informático de análisis de imagen con cámara fotográfica acoplada al microscopio óptico y lupa óptica. (Fig. 26).

El método de captura de imágenes permite relacionar la parte de implante en contacto con hueso, eliminando aquellas zonas que no interesan para la investigación (Fig. 26).

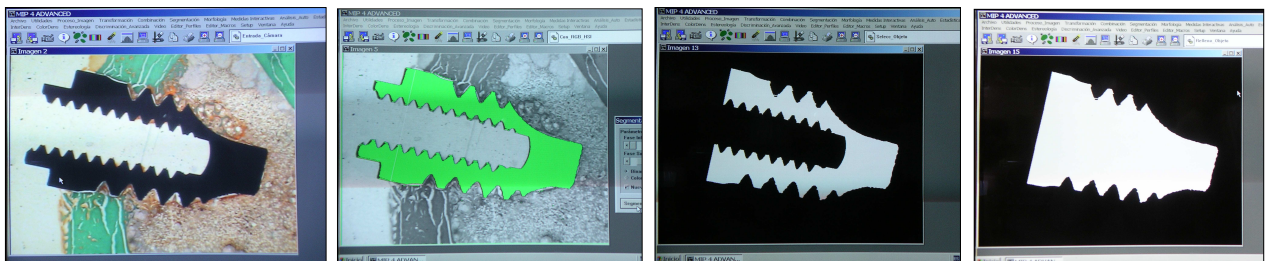
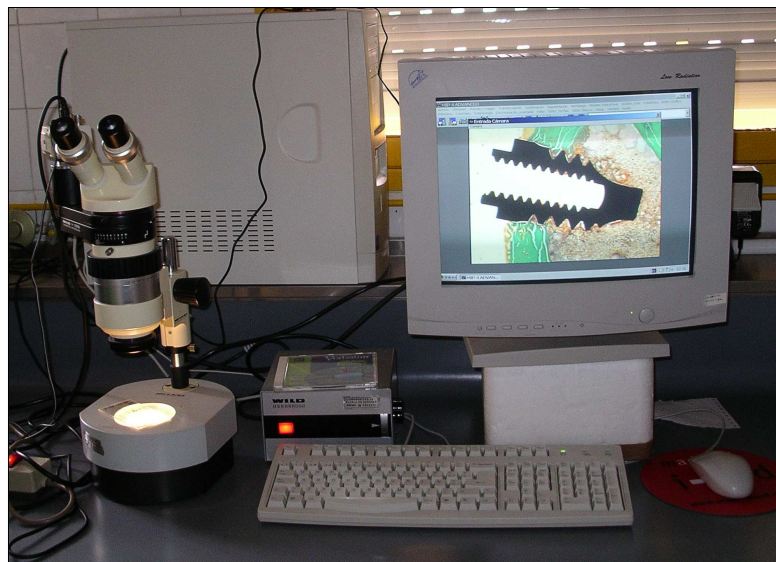


Fig 26. Lupa óptica acoplada al ordenador. El analizador de imágenes MIP-4 permite capturar y modificar las imágenes de las tinciones.

Las variables a estudiar son:

1. Cálculo del área de implante incluida dentro del hueso (despreciando la parte que queda fuera de la cortical) de cada preparación (**área imp**), que incluye tanto el tejido óseo como la cavidad medular y el tejido en neoformación.
2. Cálculo del perímetro implantario de cada preparación (despreciando la parte que queda fuera de la cortical) (**peri imp**).
3. Determinación de la línea tangente al hueso cortical que corta el implante separando la parte incluida dentro del hueso, de la que queda fuera, llamada **línea de cierre** (Fig. 27).
4. Cálculo del perímetro de estudio, entendiendo por tal el perímetro implantario menos la línea de cierre (**per estudio**).
5. Análisis de la superficie total de implante en contacto directo con hueso, esto es, el perímetro de hueso (**per hueso**).
6. Estimación del porcentaje de osteointegración o índice de afinidad (**% osteo**), también conocido como *bone-to implant-contact (BIC)* de cada preparación, que se halla dividiendo el perímetro de hueso entre el perímetro de estudio y multiplicando por cien (Tresguerres 2003):

$$\% \text{ osteointegración} = BIC = \frac{\text{Per hueso}}{\text{Per estudio}} \times 100$$

Puesto que hay varias preparaciones por tibia, posteriormente se calcula la media aritmética de los porcentajes de osteointegración correspondientes a cada una, obteniendo una media del *BIC* de cada tibia.

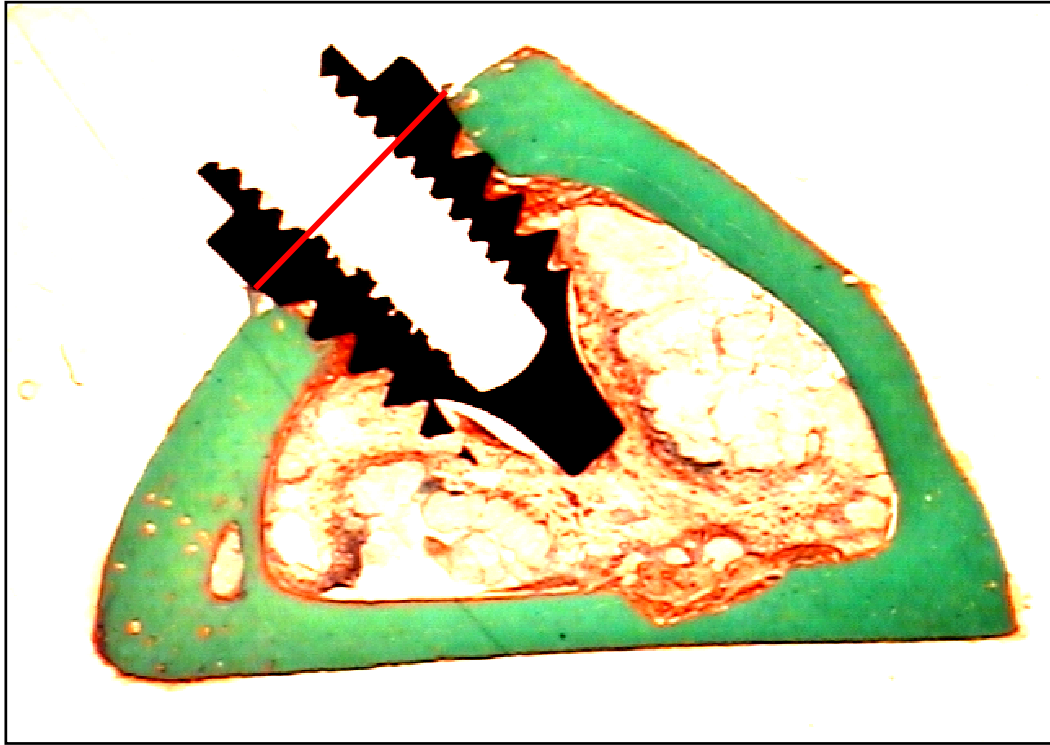


Figura 27. Línea de cierre en rojo

4.2.2.6. Tratamiento estadístico de los resultados

Se procedió al procesamiento de los resultados y al análisis estadístico de los mismos, mediante la aplicación del test de muestras pareadas, del test de ANOVA multifactorial a una vía y del test de Regresión Lineal con el programa informático StatGraphics® 5.0. Se compara fundamentalmente la influencia de los factores ovariectomía y GH en los *BIC* de los distintos grupos y su correlación con los resultados densitométricos.

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DE LA FASE DE OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL

Tras realizar las densitometrías con anestesia general, 9 de las 25 conejas murieron por distintos motivos.

En la primera parte de este trabajo, se pretendía comprobar *in vivo* el efecto de la ovariectomía bilateral más dieta hipocálcica sobre la densidad mineral ósea en tres puntos de la anatomía de los animales de experimentación (CALOTA, COLUMNA y TIBIA).

La tabla XIII muestra las variaciones del valor de *t* en los animales antes y después de la ovariectomía más dieta hipocálcica (Tabla XIII).

Tabla XIII. Variaciones de DMO antes y después de la ovariectomía más dieta hipocálcica			
RESULTADOS	Valores base DMO (mg/cm ²)	Post-ovariectomía DMO (mg/cm ²)	Test <i>t</i>
Columna cervical	0.326 ± 0.023	0.300 ± 0.023	*0.0013
Calota	0.708 ± 0.039	0.672 ± 0.047	*0.0005
Tibia	0.335 ± 0.019	0.322 ± 0.031	0.1020
Los datos se muestran como media ± D.S.			
DMO se expresa en miligramos por centímetro cuadrado			
* representa valores significativos de la variación de la DMO según el test- <i>t</i> de la hipótesis nula (p<0.05)			

Siete semanas tras la ovariectomía, se aprecia una disminución en la DMO en las tres regiones estudiadas, siendo muy significativa en la calota y la columna cervical.

En la figura 28 se observan gráficamente las variaciones de la DMO en las tres localizaciones anatómicas (Fig. 28).

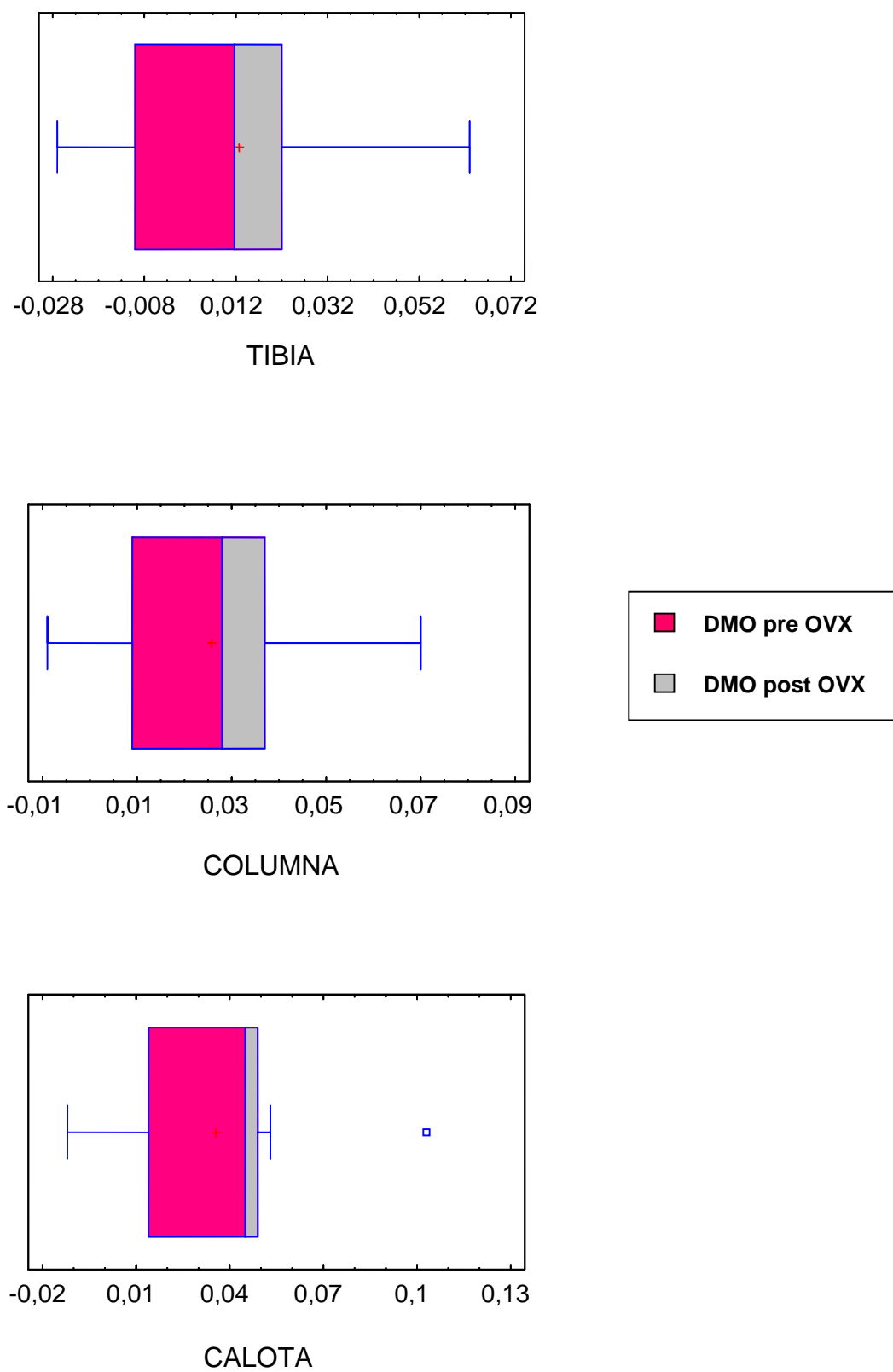


Fig. 28. Gráficos de cajas y dispersión de la densidad previa y posterior a la ovariectomía más dieta hipocálcica.

La correlación múltiple de las diferencias de DMO antes y después del procedimiento de ovariectomía más dieta hipocálcica en las distintas regiones estudiadas se muestra en la figura 29 y tabla XIV, (Fig. 29, Tabla XIV).

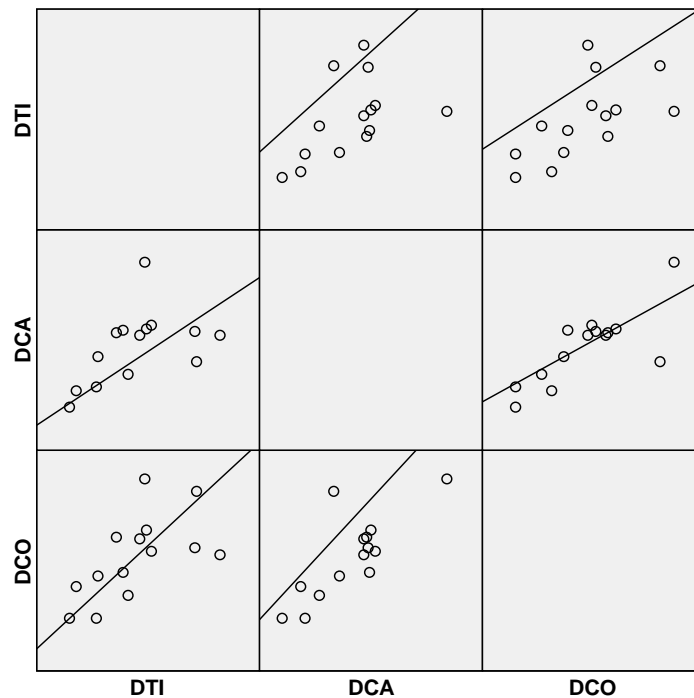


Fig 29. Gráfico de correlación múltiple entre las tres diferencias de DMO:
DTI = DMO de la TIBIA pre OVX menos DMO de la TIBIA post OVX,
DCA = DMO de la CALOTA pre OVX menos DMO de la CALOTA post OVX,
DCO = DMO de la COLUMNA pre OVX menos DMO de la COLUMNA post OVX

Tabla XIV. Correlaciones

		DTI	DCA	DCO
DTI	Correlación de Pearson	1	,499	,616(*)
	Sig. (bilateral)		,069	,019
	N	14	14	14
DCA	Correlación de Pearson	,499	1	,781(**)
	Sig. (bilateral)	,069		,001
	N	14	14	14
DCO	Correlación de Pearson	,616(*)	,781(**)	1
	Sig. (bilateral)	,019	,001	
	N	14	14	14

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Existe una correlación estadísticamente significativa ($p = 0,01$) entre la diferencia de DMO en CALOTA y COLUMNA, así como entre la de TIBIA y COLUMNA ($p = 0,19$). En el gráfico de la figura 30 se observa como la DTI está más cerca de la DCO que de la DCA, y como DCO y DCA están más próximas entre sí, formándose un ángulo entre ellas muy agudo, lo que significa que están bastante correlacionadas (Fig. 30).

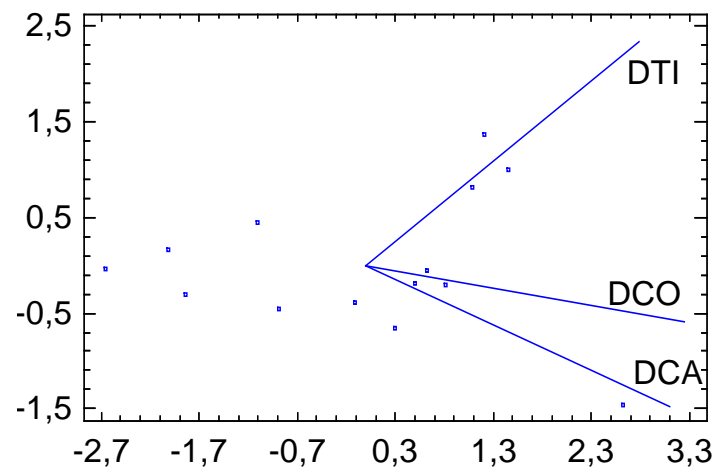


Fig. 30. Gráfico de componentes. El coseno del ángulo formado entre dos diferencias de DMO tiende más a 1 (correlación 100%) cuanto más agudo es el ángulo.

5.2. RESULTADOS DE LA FASE DE COLOCACIÓN DE IMPLANTES-GH

En el presente estudio, se distinguieron cuatro grupos bien diferenciados: por un lado las conejas ovariectomizadas que ingirieron la dieta hipocálcica (en adelante “ovariectomizadas” (OVX), que fue dividido en dos subgrupos, las que recibieron en el lecho del implante hormona del crecimiento en el momento de la colocación de la fijación (OVX-GH), y a las que no se les suministró el tratamiento (OVX-CONTROL); y un segundo grupo de conejas no ovariectomizadas (INTACTO), a las que se les aplicó el mismo procedimiento que en el grupo anterior, con hormona del crecimiento (INTACTO - GH) y sin hormona (INTACTO - CONTROL).

En el **análisis histológico** se describen la respuesta cortical, transcortical y medular de los cuatro grupos de estudio. La variable a estudiar en el **análisis morfométrico** es el porcentaje de osteointegración o *BIC* y los posibles factores que influyen son tres: la ovariectomía, la aplicación de hormona del crecimiento y la tibia donde se situó el implante (derecha o izquierda). En los datos del **análisis DEXA**, las variables a estudiar son la DMO, el CMO y el ÁREA de las distintas regiones definidas. Con el fin de valorar la precisión del aparato, se procedió a colocar una tibia en la camilla y efectuar 5 veces la densitometría sin volver a tocarla para nada. Posteriormente obtuvimos los valores de DMO, CMO y AREA de la tibia completa en cada una de las 5 mediciones. Los resultados se muestran en la tabla XV (Tabla XV).

Tabla XV. Medidas para comprobar el error del densitómetro.			
	DMO	CMO	AREA
1ª densitometría	0.303	4.243	14.00
2ª densitometría	0.302	4.205	13.93
3ª densitometría	0.298	4.221	14.16
4ª densitometría	0.298	4.180	14.00
5ª densitometría	0.299	4.133	13.81
Media	0.300	4.196	13.98
Varianza	0.0000055	0.0017848	0.01615
Desviación estandar	0.00234521	0.0422469	0.127083

Los resultados histológicos, morfométricos y densitométricos obtenidos de la comparación de los distintos grupos son los se presentan a continuación.

5.2.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

La observación de las muestras al microscópio óptico, proporciona los siguientes datos:

5.2.1.1. Grupo *INTACTO- CONTROL*

La cortical aparece compacta. Se aprecian algunas líneas de osteoblastos en el hueso periimplantario.

El endostio cercano al implante emite trabéculas hacia el mismo, y las características de estas trabéculas se corresponden con las de hueso joven (lagunas de osteocitos grandes, abundantes, desorganizadas y fibras de colágeno cortas y parcialmente desorganizadas).

La imagen de conjunto muestra, en general, signos escasos de neoformación, que predominan a nivel de las trabéculas periimplantarias. El crecimiento a expensas del periostio es escaso y sólo aparece alrededor del implante (Figs. 31-36)

5.2.1.2. Grupo *INTACTO-GH*

No se aprecian diferencias histológicas importantes frente al grupo sin GH, aunque sí existe mayor estímulo óseo que en el grupo anterior. (Figs. 31-36).

5.2.1.3. Grupo *OVX-CONTROL*

Aunque la cortical muestra un aspecto compacto, sí hay diferencias en el tejido en neoformación cuando se compara con el grupo INTACTO-CONTROL. La zona periimplantaria presenta menos crecimiento óseo y, cuando lo hay, se caracteriza por

aparecer en forma de tejido osteoide (hueso neoformado no calcificado) (Figs. 33, 34, 36 y 37).

5.2.1.4. Grupo OVX-GH

Se aprecia mayor actividad de neoformación ósea alrededor del implante, cuando se compara con el grupo anterior, además el tejido neoformado es de tipo osteoide, pero también aparece hueso joven ya osificado. Se observan algunos signos de porosidad de la cortical, aunque escasos y restringidos a zonas cercanas al implante, apreciándose alguna imagen de osteoclastos a este nivel (Figs. 35, 36 y 38).

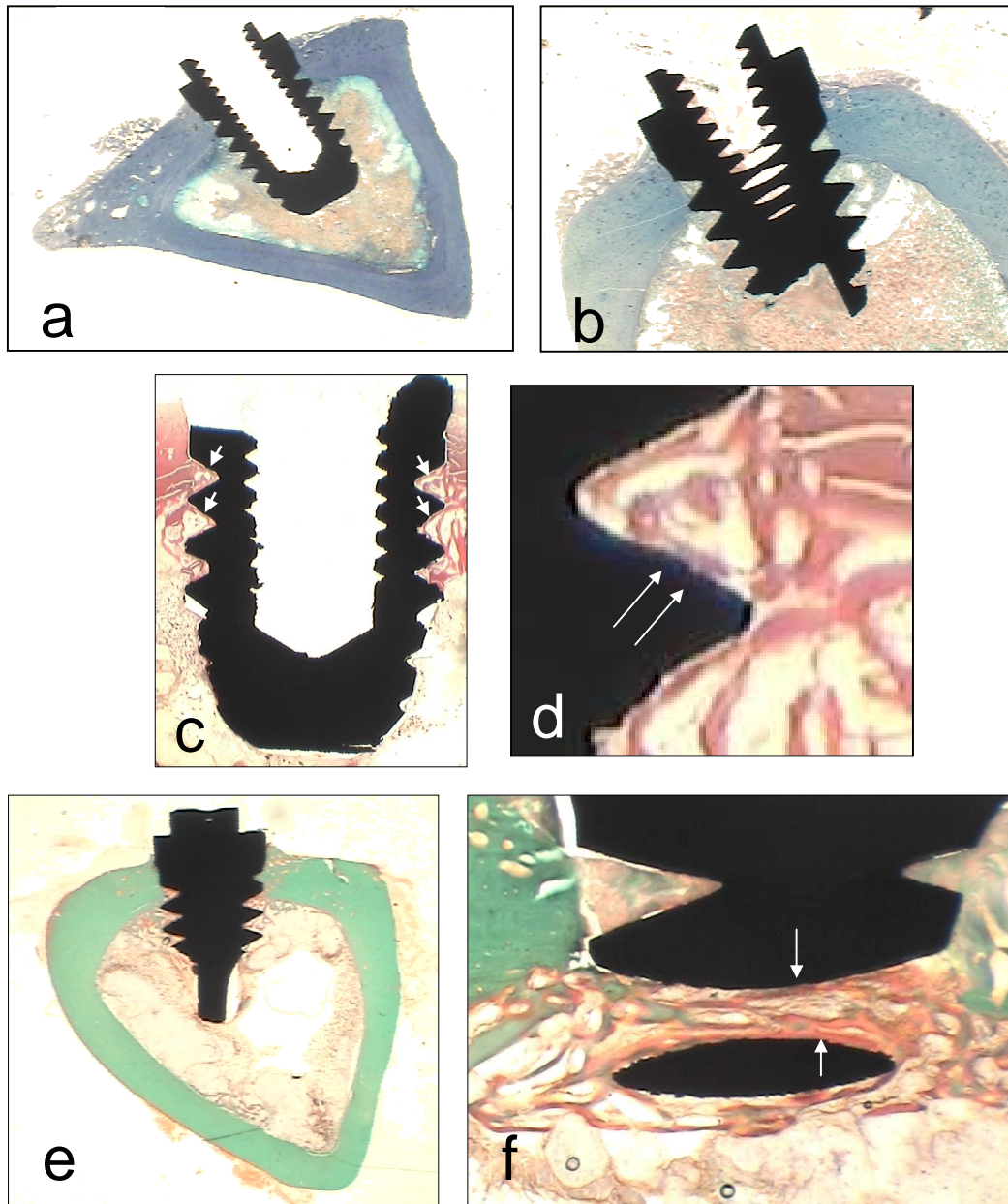


Fig 31. INTACTO/CONTROL. Imágenes de lupa; a) Tinción de azul de toluidina a 6 aumentos, visión general; b) tinción de azul de toluidina a 10 aumentos, se observa la reacción del endostio cercano al implante, emitiendo trabéculas óseas; c) tinción con hematoxilina-eosina a 17 aumentos, las flechas marcan las zonas de tejido neoformado en contacto íntimo con la superficie del implante, d) detalle de la anterior, las flechas marcan una zona de osteointegración; e) tinción de Masson a 6 aumentos, se observa crecimiento óseo en la cortical opuesta; f) tinción de Masson a 30 aumentos, se observa en color naranja el tejido osteoide, las flechas indican una zona de contacto con el implante.

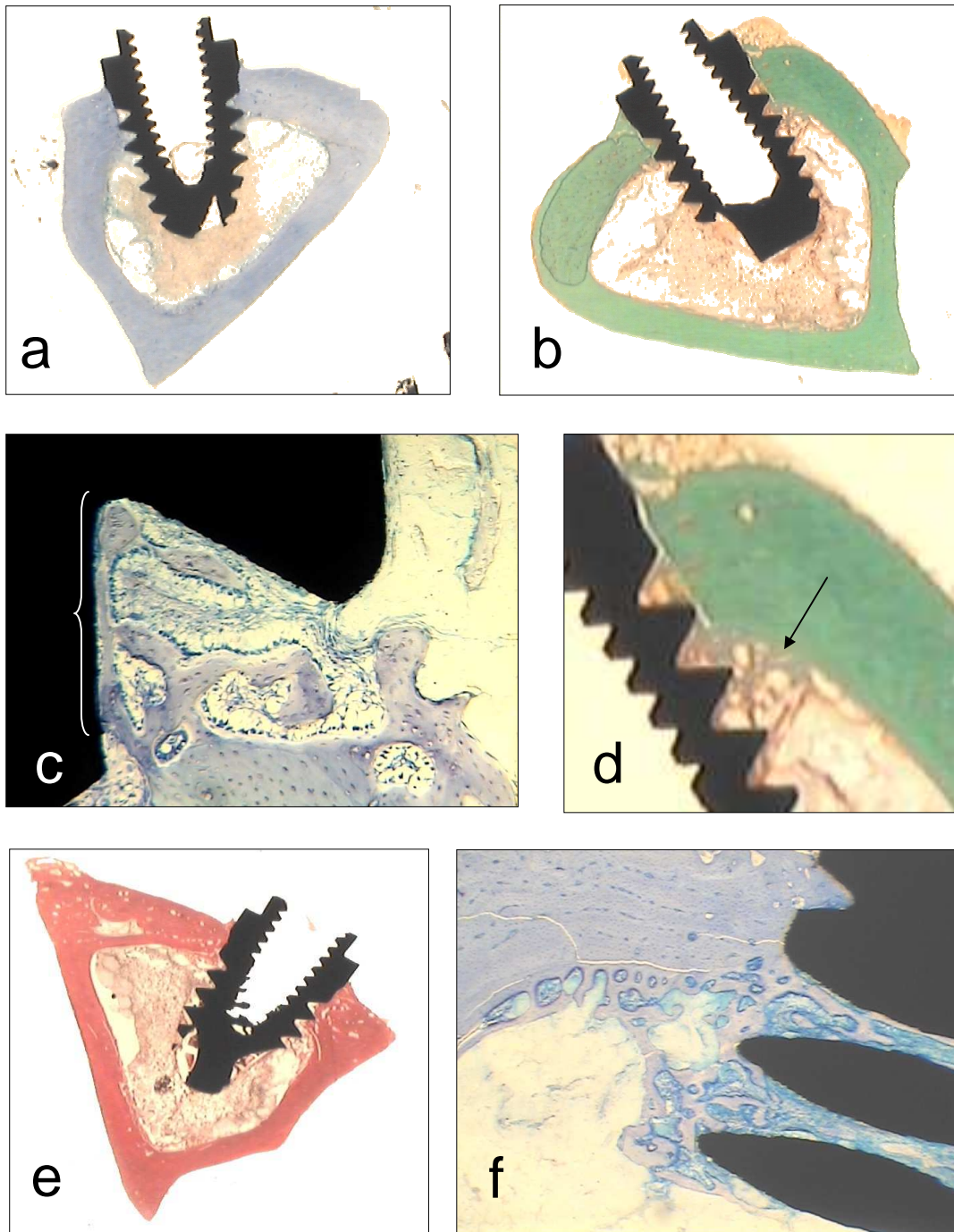


Fig 32. INTACTO/GH: a) tinción de azul de toluidina a 6 aumentos, visión general; b) tinción de Masson a 6 aumentos, se observa la cortical compacta; c) tinción de azul de toluidina a 60 aumentos, se observa una línea de osteoblastos en la zona de osteointegración, la llave indica la zona de contacto del hueso con el implante; d) detalle de b), el endostio emite trabéculas hacia el implante; e) tinción de hematoxilina-eosina a 6 aumentos, visión general; f) tinción de azul de toluidina a 30 aumentos, en azul claro, trabéculas óseas neoformadas en contacto con el implante.

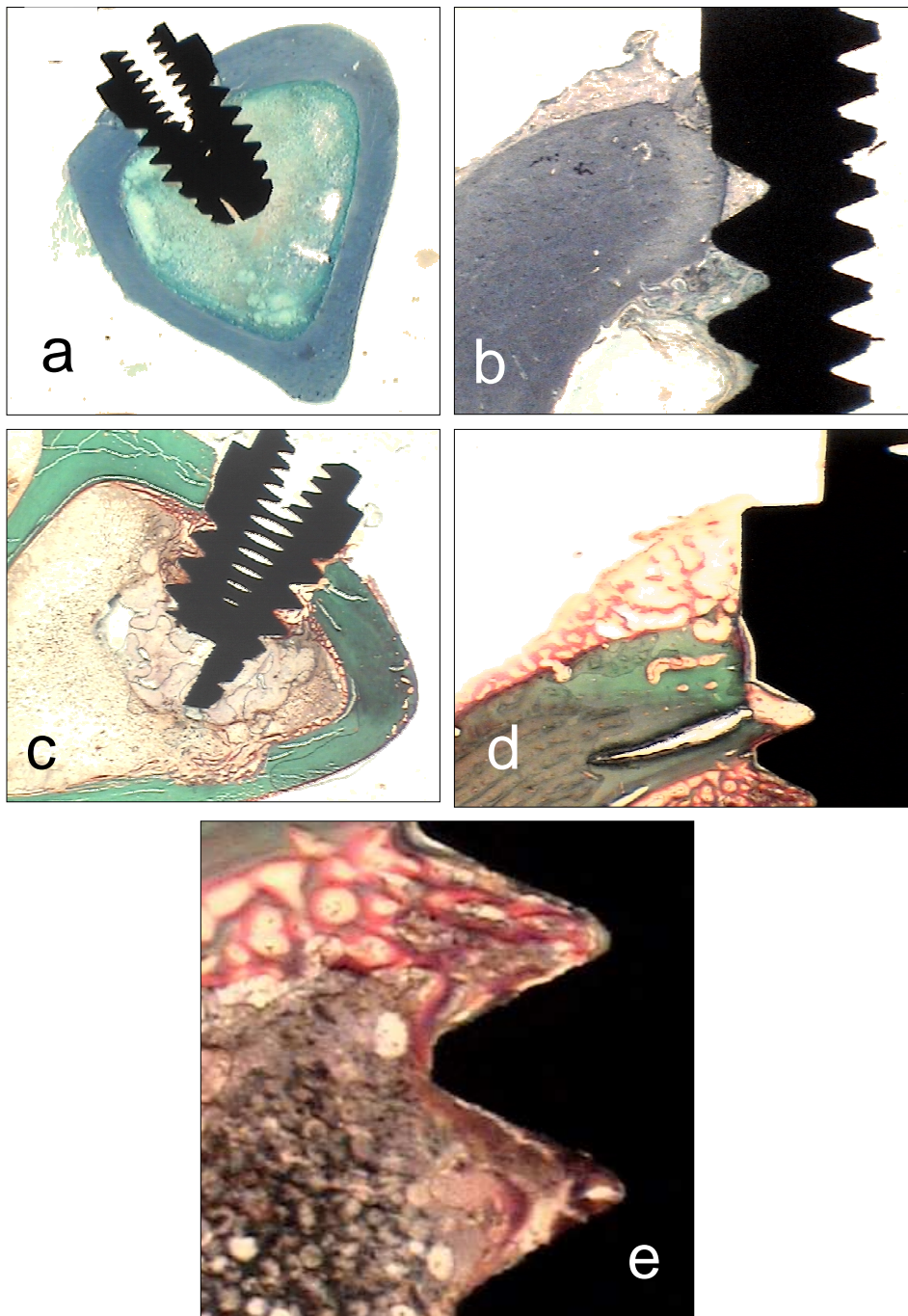


Fig 33. OVX/CONTROL: a) tinción de azul de toluidina a 6 aumentos, visión general; b) tinción de azul de toluidina a 25 aumentos, se observa buena calidad del hueso cortical y la escasa osteointegración; c) tinción de Masson a 9 aumentos, se aprecia el crecimiento del endostio, tanto en la zona coronal, como en la apical al implante; d) tinción de Masson a 22 aumentos, detalle del crecimiento perióstico; e) tinción de Masson a 30 aumentos, se evidencia la presencia de tejido osteoide neoformado (naranja) en el interior de las espiras del implante y entrando en contacto con el mismo.

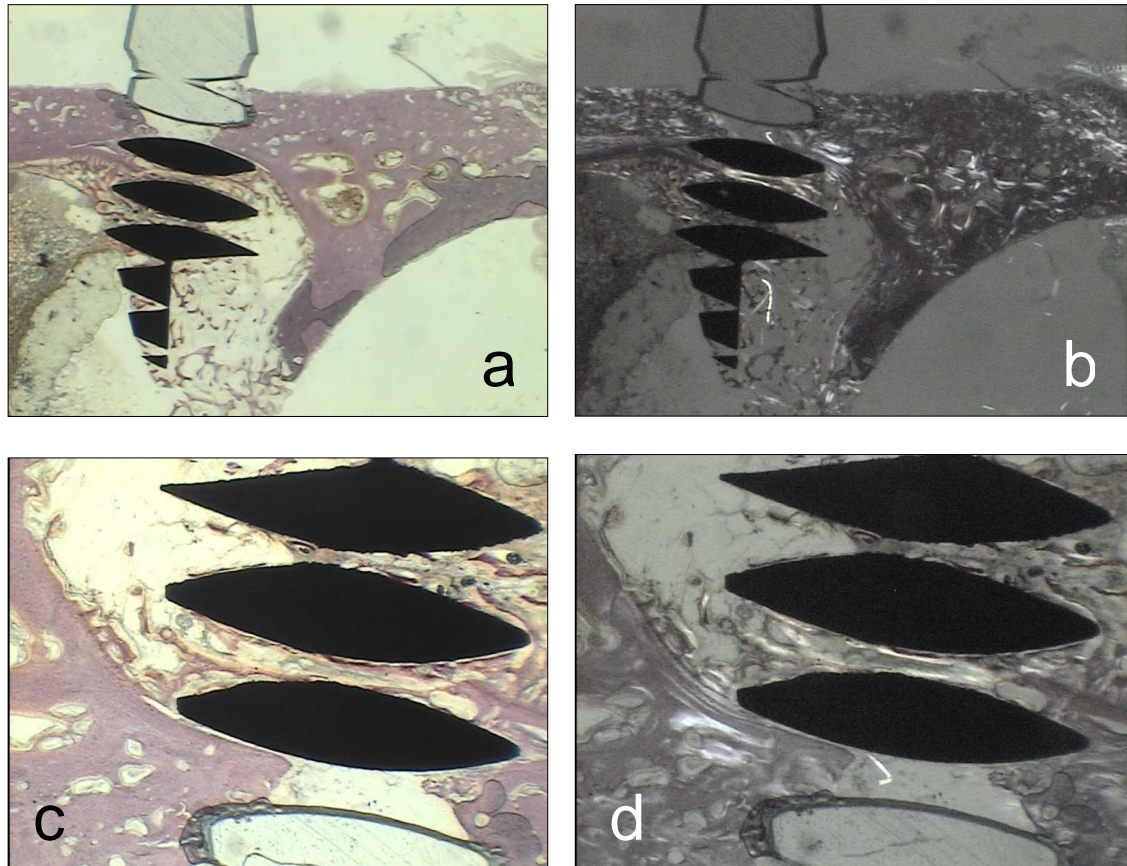


Fig 34. OVX/CONTROL: a) tinción de Sirius a 10 aumentos; b) tinción anterior vista con luz polarizada haciéndose evidentes las fibras de colágeno que se disponen paralelas a la superficie del implante; c) tinción de Sirius a 30 aumentos; d) tinción anterior vista con luz polarizada, en blanco brillante, las fibras de colágeno se disponen paralelas al implante.

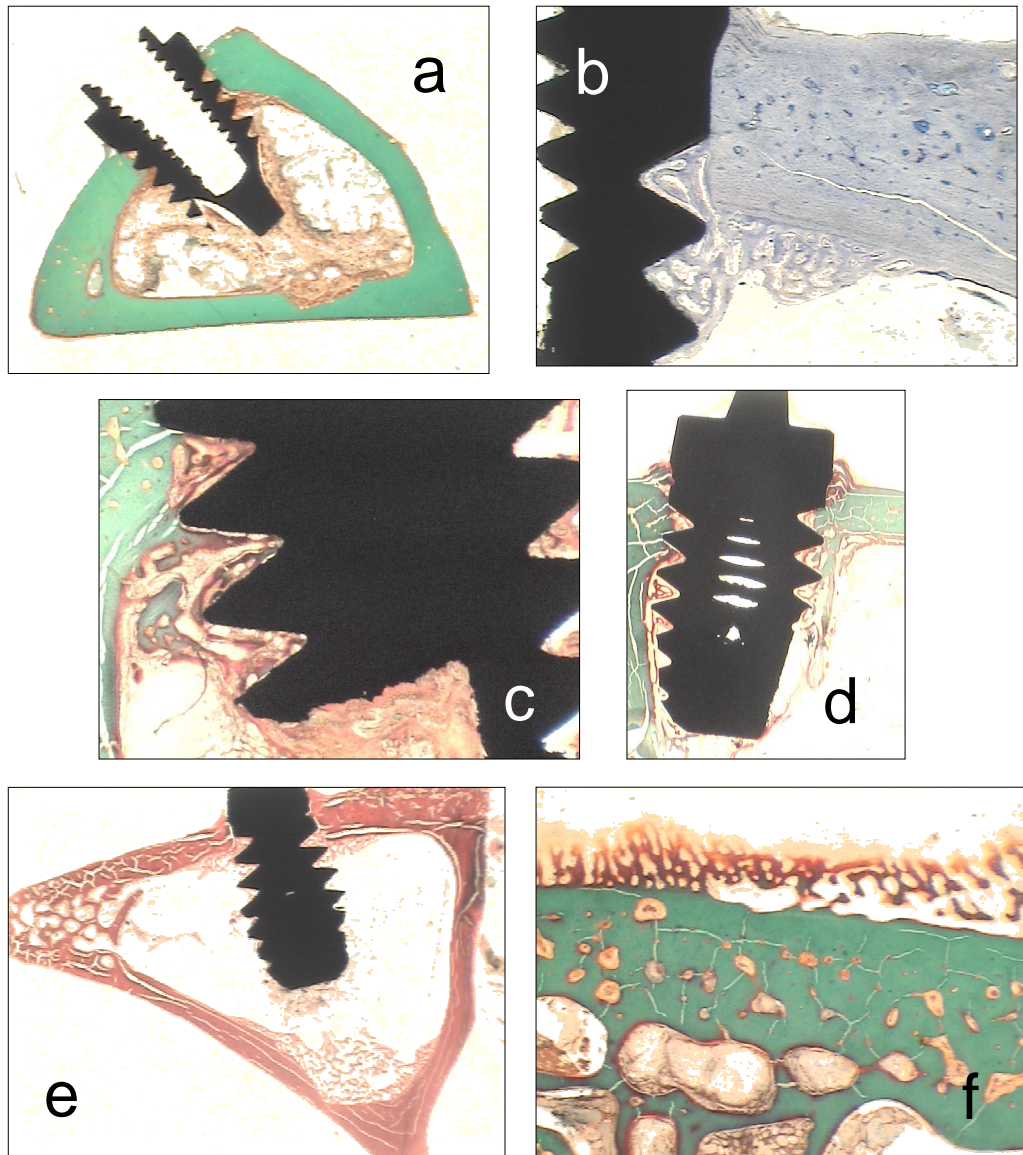


Fig 35. OVX/GH: a) tinción de Masson a 6 aumentos, visión general; b) tinción de azul de toluidina a 30 aumentos, se observa el remodelado del hueso cortical y el crecimiento desde el endostio; c) tinción de Masson a 30 aumentos, se aprecia la presencia de tejido osteoide; d) tinción de Masson a 15 aumentos, formación de tejido osteoide; e) tinción de hematoxilina-eosina a 7 aumentos, se aprecia el crecimiento óseo en la cortical opuesta al implante; f) tinción de Masson a 30 aumentos, se observa el crecimiento perióstico y la cortical.

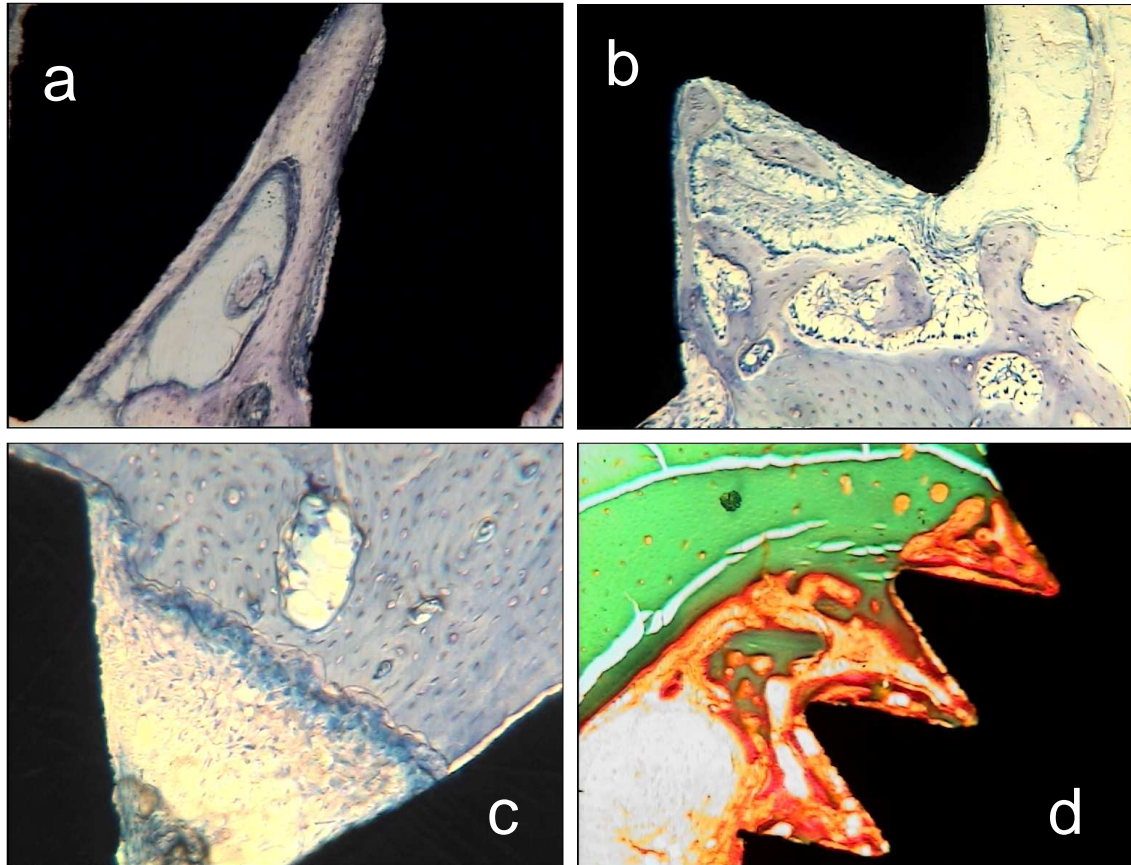


Fig 36. COMPARACIÓN DE GRUPOS DE ESTUDIO, MO a) INTACTO/CONTROL Tinción de azul de toluidina a 60 aumentos. Se observan las características propias del crecimiento normal del hueso, con osteointegración normal, con poco estímulo. Hay menor respuesta de formación ósea, con menos osteoblastos y la velocidad de formación es menor; b) INTACTO/GH, tinción de azul de toluidina a 60 aumentos: se observa la línea de osteoblastos en la zona de osteointegración, aquí se aprecia mayor estímulo óseo, con más actividad, crecimiento y número de osteoblastos, así como más espacio de osteoide que en a); c) OVX/CONTROL: tinción de azul de toluidina a 100 aumentos, se aprecia menor osteointegración que en las anteriores, apreciándose la línea de osteoblastos después del frente de osteoclastos (borde festoneado); d) OVX/GH, tinción de Masson a 25 aumentos, se observa la osteointegración en los valles de las espiras del implante y mayor cantidad de tejido osteoide que en el grupo INTACTO/CONTROL.

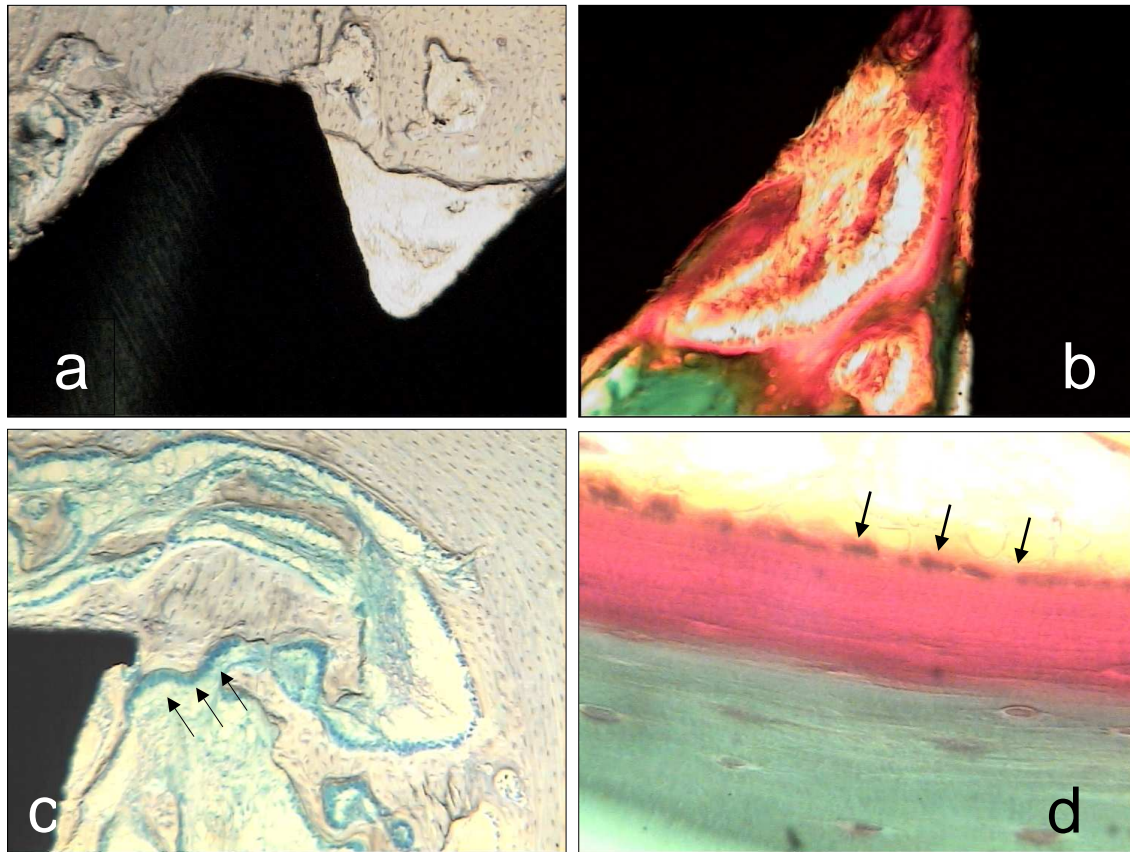


Fig. 37 OVX/CONTROL MO. A) Tinción de azul de toluidina a 60 aumentos, no se observa penetración del hueso en las espiras, no hay crecimiento dentro del valle, en contra de lo que sucede en la imagen b) de la figura anterior; b) tinción de Masson a 100 aumentos, cuando se osteointegra algo, es poco y con tejido osteoide. Se ve el frente de osteoblastos justo al lado del tejido osteoide; c) tinción de azul de toluidina a 60 aumentos, se aprecia actividad osteoblástica alrededor del implante (frente de osteoblastos); d) tinción de Masson a 400 aumentos, se distingue el tejido osteoide, con las células osteoblásticas en empalizada (rojo) y debajo el hueso maduro (verde).

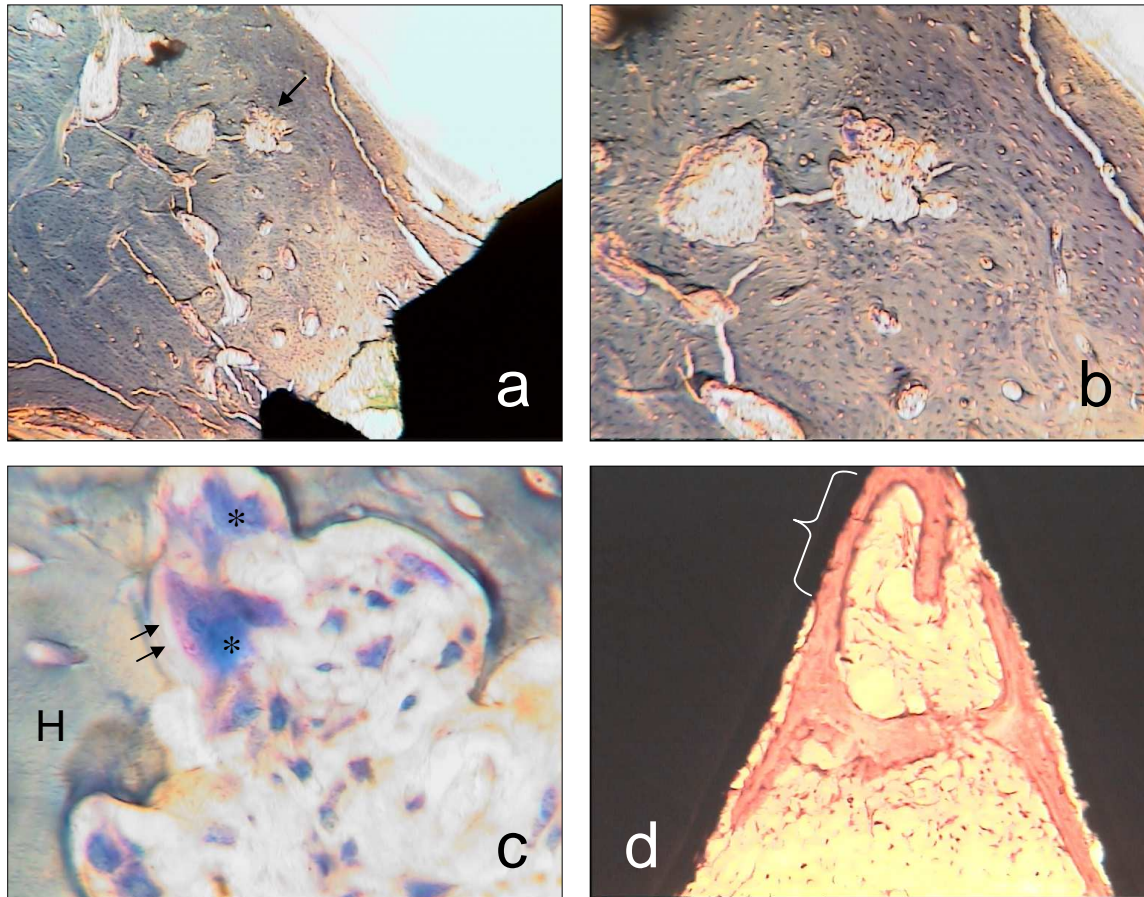


Fig. 38: OVX-GH MO: a) Tinción de azul de toluidina a 25 aumentos, se aprecia un ligerísimo grado de reabsorción en la cortical periimplantaria que no se observa en el grupo sin GH (flecha); b) detalle de a) a 60 aumentos, zona de reabsorción en la cortical; c) detalle de a) a 400 aumentos, se observan varios osteoclastos y se aprecia el borde festoneado (flechas): H = hueso, * = osteoclasto; d) tinción de hematoxilina-eosina a 100 aumentos, se aprecian trabéculas de hueso íntimamente unidas al implante (osteointegración) (llave).

5.2.2. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

La observación de las muestras mediante el MIP-4 proporcionó los siguientes datos del *BIC* (Tabla XVI y Fig. 39):

Tabla XVI. Variaciones del <i>BIC</i> en los distintos grupos de estudio.				
	OVX		INTACTO	
	GH	CONTROL	GH	CONTROL
	36,13 \pm 9,86	22,58 \pm 7,25	28,90 \pm 7,49	34,89 \pm 4,69

Los datos se muestran como media \pm D.S.

El *BIC* se expresa en porcentaje.

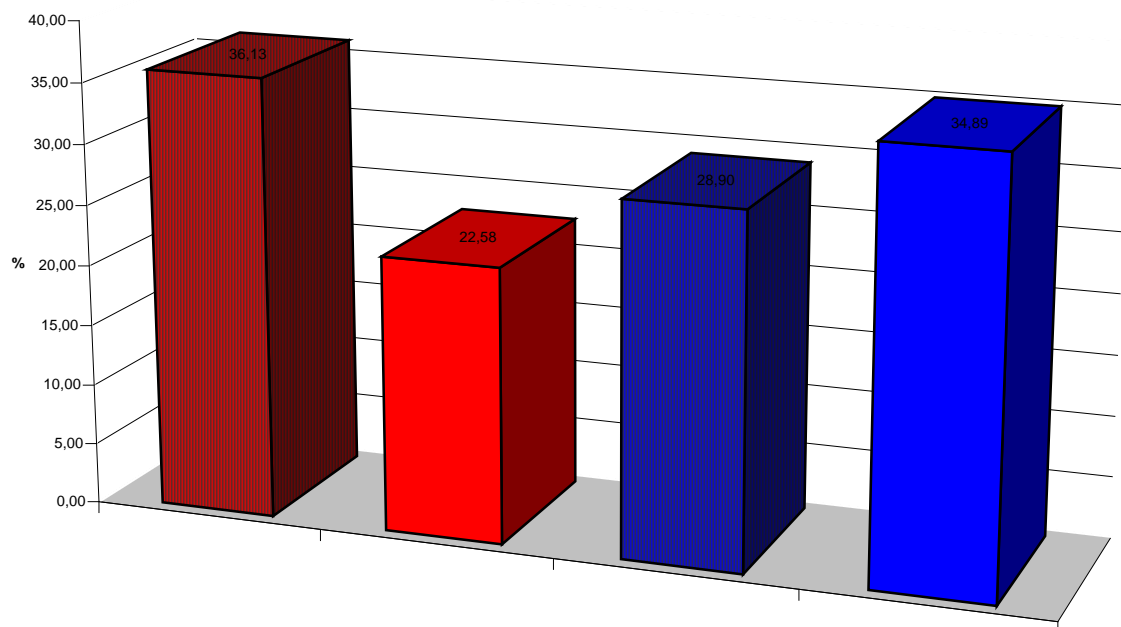


Fig. 39. Representación gráfica de las medias del *BIC* en los distintos grupos de estudio.

En primer lugar se estudió si el factor TIBIA era determinante en los resultados. Para ello se utilizó el test de muestras pareadas, para comparar los datos de las tibias derecha e izquierda. Los resultados demostraron que no existían diferencias significativas, por lo que se procedió a utilizarlos de forma conjunta.

Los datos morfométricos se analizaron mediante el test de ANOVA multifactorial, estudiando como variable el *BIC*, y como factores la ovariectomía (OVX), la aplicación del tratamiento (GH) y la tibia. Se aplica la siguiente fórmula:

$$y_{ijkp} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkp}$$

El *BIC* (y_{ijkp}) es igual a la media global (μ) más el efecto de la GH (α_i), más el efecto de la ovariectomía (β_j), más el efecto de la tibia (γ_k), más las interacciones entre estos factores [$(\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk}$], más el error estadístico (ε_{ijkp}).

Los resultados muestran que los efectos principales de los tres factores no son significativos sobre el *BIC*, ni tampoco son significativos los efectos de las interacciones entre los factores, excepto en la interacción de la ovariectomía y del tratamiento con GH que tiene un efecto estadísticamente significativo sobre *BIC* con un $p = 0,0024 < 0,05$, por lo que resulta muy significativo (Tabla XVII).

Tabla XVII.
Análisis la Varianza Multifactorial para el porcentaje de osteointegración. Suma de cuadrados

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:GH	91,0257	1	91,0257	1,60	0,2190
B:OVX	57,3014	1	57,3014	1,01	0,3265
C:TIBIA	12,7889	1	12,7889	0,22	0,6402
INTERACCIONES					
AB	663,052	1	663,052	11,63	0,0024
AC	83,0924	1	83,0924	1,46	0,2396
BC	30,6956	1	30,6956	0,54	0,4705
ABC	188,493	1	188,493	3,31	0,0821
RESIDUAL	1311,22	23	57,0095		
TOTAL (CORREGIDO)	2452,04	30			

Todos los F-ratios están basados en el error del cuadrado medio residual.

Por tanto, el modelo anterior se puede simplificar y aplicamos el modelo de reducción (Tabla XVIII), relacionando el *BIC* con los factores predictivos: tratamiento con GH y ovariectomía:

$$y_{ijkp} = \mu + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijkp}$$

El *BIC* (y_{ijkp}) es igual a la media global (μ) más el efecto de interacción entre la ovariectomía y la GH ($(\alpha\beta)_{ij}$), más el error estadístico (ε_{ijkp}).

Encontramos que el p-valor es inferior a 0,01 ($p = 0,0033$; error estándar del estadístico = 7,9), por lo que se puede decir que existe una **relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de osteointegración y la interacción entre las variables predictivas (GH y ovariectomía)** (Tablas XVIII y XIX; Fig. 40).

Tabla XVIII. Modelos Lineales Generales para el BIC

Número de variables dependientes: 1
 Número de factores categóricos: 2
 Número de factores cuantitativos: 0

Análisis de la Varianza para %OSTEO

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	641,145	1	641,145	10,27	0,0033
Residual	1810,89	29	62,4445		
Total (Corr.)	2452,04	30			

Estadísticamente significativo = $p < 0,01$

Error Estándar del Est. = 7,90218

Interacciones e Intervalos LSD del 95,0 %

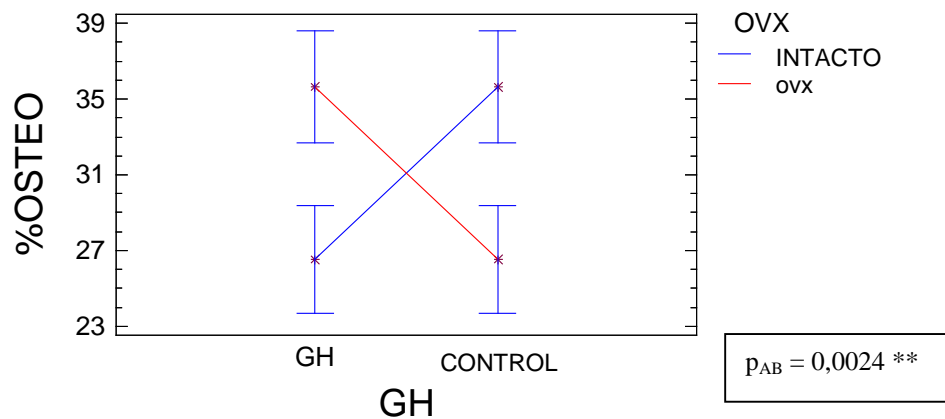


Fig. 40: Porcentaje de osteointegración en el grupo de conejas ovariectomizadas. Se representan las medias y el 95 % de intervalo de confianza, ** $p < 0,01$

Tabla XIX.
Menores Cuadrados Medios para %OSTEO con Intervalos de Confianza del 95,0 por ciento.

Nivel	Contaje	Media	Error Estand.	Límite Inferior	Límite Superior
GRAN MEDIA	31	31,0839	1,42001	28,1796	33,9881
GH por OVX					
GH no ovx	10	26,5338	1,97555	22,4933	30,5742
GH ovx	9	35,634	2,04033	31,461	39,807
no no ovx	6	35,634	2,04033	31,461	39,807
no ovx	6	26,5338	1,97555	22,4933	30,5742

El gráfico de la figura 40 muestra el efecto de la interacción de los factores OVX y GH, de tal modo que se observa que el tratamiento con **GH aumenta el *BIC* en las conejas ovariectomizadas** con respecto a las no ovariectomizadas y a las CONTROL. También se aprecia que la no aplicación del tratamiento, se traduce en más *BIC* en el grupo INTACTOS, siendo el *BIC* menor si hay OVX o si se aplica la GH. Por tanto, en la **osteoporosis experimental la aplicación de 2 U.I. de rhGH mejora significativamente ($p < 0,01$) el *BIC* a los 15 días** y en las conejas sanas la aplicación de esta dosis de la hormona no parece tener un efecto positivo (disminuye el *BIC*).

Al realizar las preparaciones, las muestras correspondientes a la tibia izquierda de la coneja nº 7 se estropearon, por lo que no obtuvimos valores del porcentaje de osteointegración. El modelo estadístico realiza una predicción automática adjudicándole el valor que debería tener (Tabla XX).

Tabla XX. Residuos Inusuales para %OSTEO				
Fila	Y	Y Predicha	Residual	Residual Estudentizado
7	20,21	35,634	-15,424	-2,14

Los resultados del análisis morfométrico corroboran nuestra hipótesis de trabajo: la aplicación de 2 U.I. de GH en el lecho quirúrgico de un implante de titanio colocado en tibia de conejas ovariectomizadas mejora de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$) el porcentaje de osteointegración alrededor de la fijación, a los 15 días de su implantación.

5.2.3. ANÁLISIS mediante DEXA

Se realizó el **análisis densitométrico** de las regiones definidas (Fig. 21) en todas las tibias.

De nuevo se evaluó si el factor TIBIA era determinante en los resultados. Con el test de muestras pareadas se compararon los datos de las tibias izquierda y derecha de cada una de las variables a analizar y de cada región. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que los datos de las tibias se utilizaron de forma conjunta, excepto en el área de la región 1/9 que se estudió analizando las áreas de las tibias derecha e izquierda por separado.

Se aplicó el test de ANOVA multifactorial estudiando en cada una de las regiones definidas las variables DMO, CMO, y ÁREA, siendo de nuevo los posibles factores influyentes: la ovariectomía (OVX), la aplicación de hormona del crecimiento (GH), y la tibia donde se situó el implante (TIBIA derecha o izquierda). La tabla XXI muestra tanto los efectos principales como las interacciones dobles y triples (Tabla XXI).

En la regiones **TOTAL y 1/3**, no se encontraron diferencias significativas en la DMO, en el CMO, ni en el ÁREA entre los distintos grupos de estudio.

A medida que nos acercamos a la región donde se colocó el implante, vamos encontrando valores de P significativos. En la región **1/9** observamos que el factor OVX tiene un efecto estadísticamente significativo ($p = 0,04$) sobre el contenido mineral óseo, disminuyendo en el grupo ovariectomizado, pero sin relación con la GH.

En la región **LATERAL** no existen diferencias estadísticamente significativas, aunque sí se puede hablar de una fuerte tendencia ($p = 0,053$) a disminuir el ÁREA en el grupo que recibió el tratamiento con GH. Las interacciones entre los factores tampoco tienen significación estadística.

Tabla XXI. Análisis mediante DEXA (Valores de P para el test de ANOVA Multifactorial)						
REGIÓN	Variable de respuesta	FACTORES PRINCIPALES			INTERACCIONES	COMENTARIO
		OVX	GH	TIBIA		
TOTAL	DMO	-	-	-	-	
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	-	-	-	
1/3	DMO	-	-	-	-	
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	-	-	-	
1/9	DMO	-	-	-	-	
	CMO	↓0,04*	-	-	-	
	ÁREA	-	-	-	-	
LATERAL	DMO	-	-	-	-	
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	↓0,053	-	-	
SUMA	DMO	↓0,051	-	-	↓0,003** (OVX-GH-TIBIA)	↓ DMO en OVX, GH y TIBIA izquierda
	CMO	↑0,08	↑0,01**	-	↑0,03* (OVX-GH)	
	ÁREA	↑0,01**	↑0,02*	-	↑0,02* (OVX-GH-TIBIA)	
IMPLANTE	DMO	↓0,005**	-	-	-	
	CMO	↑0,01**	↑0,04*	-	↑0,08 (OVX-GH)	↓ DMO en OVX
	ÁREA	↑0,008**	-	-	-	
ALREDEDOR	DMO	↓0,01**	-	-	↓0,001* (OVX-GH-TIBIA)	↓ DMO en OVX, GH y TIBIA izquierda
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	↑0,056	-	↑0,02* (OVX-GH-TIBIA)	
Valores en negrita = estadísticamente significativo : * p < 0,05; ** p < 0,01						
(-) = No significativo						
↑ ó ↓ = efecto positivo o negativo						

En la región definida como **SUMA**, comienzan a aparecer resultados significativos. Aparece una fuerte tendencia al descenso de la densidad en el grupo OVX ($p = 0,051$) y la interacción de los tres factores tiene un efecto altamente significativo ($p = 0,0033$), produciéndose una disminución de la DMO asociada a OVX, GH y tibia IZQUIERDA. El CMO aumenta de forma estadísticamente significativa en el grupo GH y hay una tendencia a aumentar en el grupo OVX ($p = 0,08$); la interacción de ambos factores es altamente significativa ($p = 0,03$). El aumento del ÁREA es estadísticamente significativo en el grupo OVX ($p = 0,01$) y en el grupo GH ($p = 0,02$), existiendo una interacción significativa entre los tres factores ($p = 0,02$).

Si nos acercamos todavía más a la herida quirúrgica, justo en las inmediaciones de la misma y en la región definida como **IMPLANTE**, encontramos valores de P significativos: disminución de la DMO ($p = 0,005$) en el grupo OVX frente al INTACTO, aumento del CMO tanto en el grupo OVX ($p = 0,01$), como en el grupo GH ($p = 0,04$) e incremento del ÁREA en el grupo OVX ($p = 0,008$).

Para ver la influencia en las inmediaciones del implante, descontando la zona de la fijación, se definió la región **ALREDEDOR**, donde se observa un descenso en la DMO ($p = 0,01$) en el grupo OVX (Fig. 41); la interacción de los tres factores tiene un efecto estadísticamente significativa ($p = 0,001$) sobre la densidad, que disminuye en la tibia. No hay diferencias en el CMO, ni en el ÁREA, (aunque sí una tendencia: $p = 0,056$), pero sí que la interacción de los tres factores afecta al ÁREA ($p = 0,02$), haciendo que aumente en el grupo tratado con GH, OVX, y en la tibia izquierda.

En general, se observa una disminución de la densidad mineral ósea (muy significativa en la región IMPLANTE) en los grupos ovariectomizados y cuando se produce la interacción de los factores “OVX”, “GH” y “TIBIA IZQDA.”. Esto quiere decir que el factor ovariectomía produce una disminución de la densidad y que la aplicación de GH en el grupo OVX hace que haya menor densidad.

Los resultados morfométricos y densitométricos, aunque aparentemente contradictorios, sí se corresponden, ya que se encuentra menor DMO justamente en el grupo en el que se aprecia mayor *BIC*, puesto que según el análisis histológico, la GH mejora la actividad osteogénica en el grupo OVX, aumentando la presencia de tejido neoformado alrededor del implante, a los 15 días en los grupos OVX y GH (Fig. 42, 43 y 44).

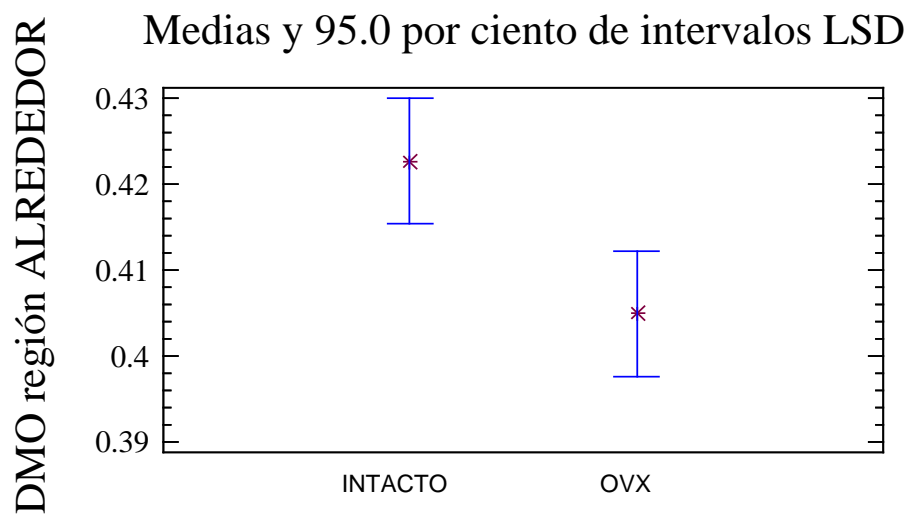


Fig. 41: Densidad mineral ósea alrededor del implante en el grupo de conejas tratadas con GH. Se representan las medias y el 95 % de intervalo de confianza. $P = 0,01$.

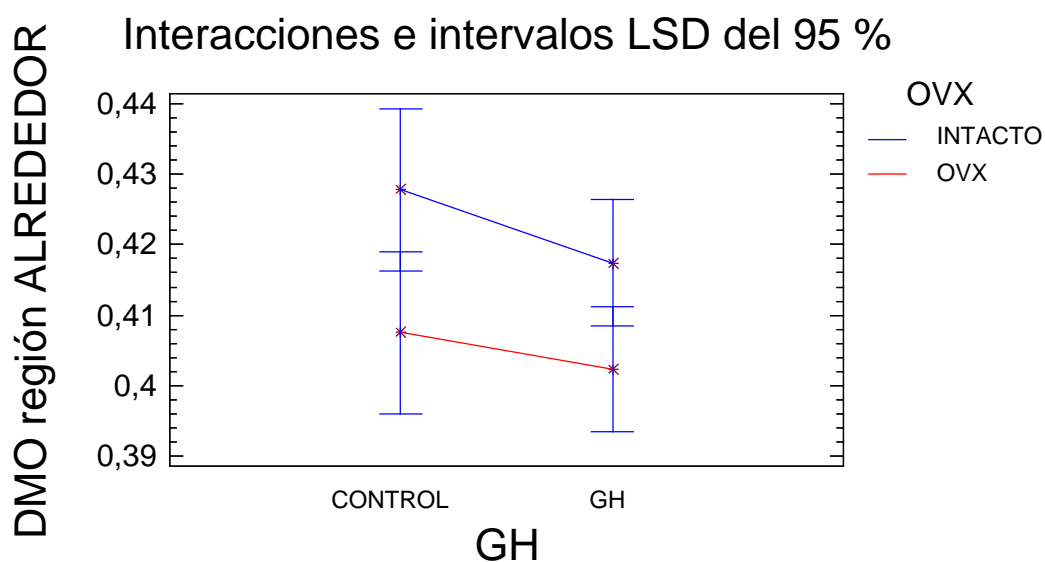


Fig. 42: Densidad mineral ósea alrededor del implante. Se representa la interacción de los factores GH y OVX, las medias y el 95 % de intervalo de confianza.

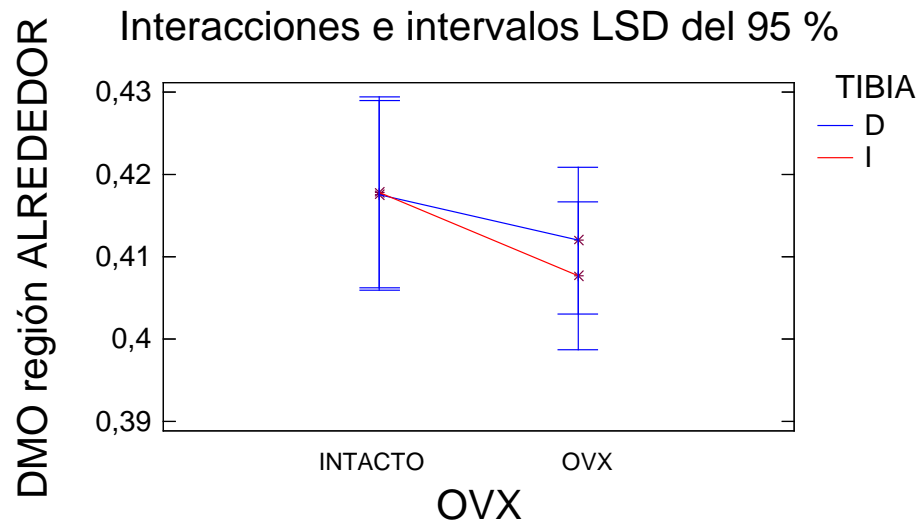


Fig. 43: Densidad mineral ósea alrededor del implante. Se representa la interacción de los factores OVX y TIBIA, las medias y el 95 % de intervalo de confianza.

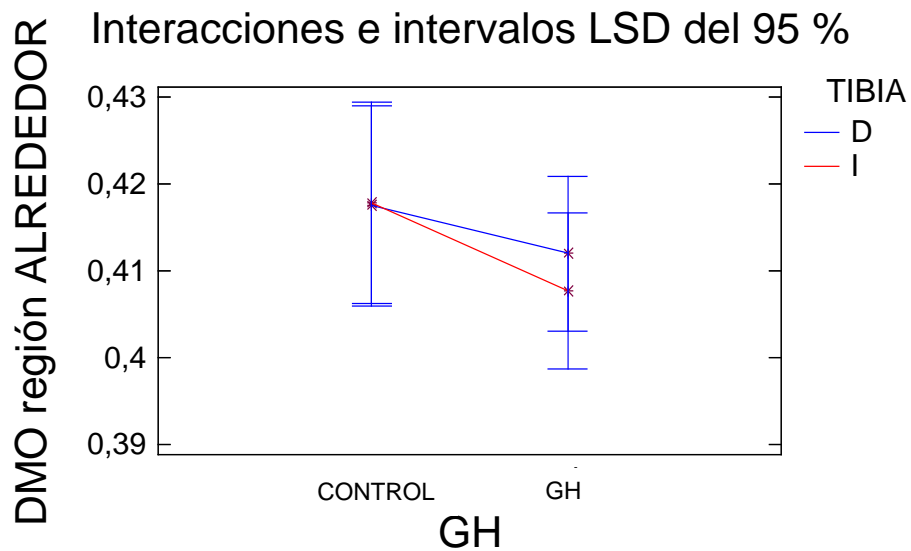


Fig. 44: Densidad mineral ósea alrededor del implante. Se representa la interacción de los factores GH y TIBIA, las medias y el 95 % de intervalo de confianza.

6. DISCUSIÓN

Para el conocimiento profundo de los procesos regenerativos que suceden en los maxilares al aplicar distintos tratamientos y en particular, en las situaciones de déficit óseo, es importante disponer en Odontología de un modelo de osteopenia experimental fiable en el que se puedan investigar el diseño y uso de distintos dispositivos de regeneración (p.e. implantes dentales, distractores óseos, sustitutos de injertos óseos, etc.) así como sus características biológicas y biomecánicas, en el que se puedan obtener unos resultados extrapolables a la clínica diaria. La elección cuidadosa de un modelo de experimentación animal adecuado para el estudio de la osteoporosis minimiza las limitaciones asociadas con el estudio de la enfermedad en humanos, permitiendo utilizar un gran número de animales y manteniendo el control del experimento en todo momento (Newman *et al.*, 1995).

Los resultados de nuestro estudio demuestran que la combinación de ovariectomía más dieta hipocálcica induce una rápida disminución de la DMO (a las seis semanas), medida mediante DEXA, siendo muy significativa en CALOTA y COLUMNA cervical ($p < 0,01$) y presentando una fuerte tendencia en la TIBIA de la coneja, consiguiendo una rápida osteoporosis experimental.

Otros autores también han logrado inducir osteoporosis en animales de laboratorio. Existen distintos modelos de osteoporosis experimental, que varían según el animal de experimentación utilizado, la forma de conseguir la osteoporosis experimental y las distintas herramientas para analizar la osteoporosis.

El modelo experimental de osteoporosis en **roedores** es el más usado y tiene múltiples ventajas: no son caros, son fáciles de alojar y se pueden utilizar cepas genéticamente alteradas. Por su vida media corta, permite estudiar las alteraciones de la edad (Duarte *et al.*, 2005). Como se han utilizado en tantos estudios, se conoce bastante sobre su *turn over* óseo (Ortoft y Oxlund, 1996) y sobre los efectos de la dieta en el hueso.

Se ha constatado adelgazamiento de la cortical e incremento de la fragilidad ósea con el envejecimiento en ratas. Aunque los roedores no experimentan menopausia natural, la ovariectomía sí produce menopausia artificial.

La **coneja** ovariectomizada se ha usado ampliamente como modelo de osteoporosis postmenopáusica, puesto que la osteopenia que se produce tras la extirpación ovárica es muy similar a la que sucede en los humanos (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Mori *et al.*, 1997), tanto en la tibia como en la mandíbula (Cao *et al.*, 2001, 2004). En concreto, el conejo Nueva Zelanda posee un *turn over* más rápido que el de los primates, y en contra de lo que sucede en otros mamíferos de pequeño tamaño como la rata, el ratón o el cobaya, los conejos alcanzan la madurez esquelética (cierre de las placas de crecimiento) poco tiempo después de completar el desarrollo sexual aproximadamente a los 6 meses. Es fácil de alojar, barato y manejable (Newman *et al.*, 1995) y se pueden obtener cepas genéticamente homogéneas.

Su tamaño relativamente pequeño impide la experimentación de prótesis ortopédicas, pero presentan un tamaño aceptable para la investigación de implantes dentales pequeños en el fémur, la tibia y la mandíbula (Turner 2001).

Lo ideal sería utilizar conejas viejas, que además de que resultan más económicas, no es necesario realizarles la ovariectomía para conseguir la osteoporosis, pero debido a la gran mortalidad asociada a la administración de anestesia general que presenta este grupo de edad, hace que resulte poco útil para este tipo de estudio (Tresguerres, 1999).

La **rata** ovariectomizada (OVX) es sin duda el animal más utilizado en los estudios sobre la patofisiología, diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis (Fini *et al.*, 2004; Namkung-Matthai *et al.*, 2001; Ortoft y Oxlund, 1996; Duarte *et al.*, 2005).

Pero aunque los estudios sobre animales pequeños como la rata son correctos desde un punto de vista científico y ético, y son aceptables en las primeras fases de investigación, el problema surge precisamente por su pequeño tamaño, que obliga a utilizar implantes miniaturizados diferentes de los usados en clínica, además de que la calidad ósea de la rata difiere bastante de la del hombre (ausencia de sistema haversiano en los animales jóvenes y alteraciones de la función osteoblástica en las últimas etapas de la deprivación estrogénica) (Turner 2001). Por todo ello es necesario adoptar un modelo animal con un nivel filogenético superior, ya sean conejos, minicerdos, ovejas, gatos, perros o monos.

El **cobaya** es uno de los mamíferos más populares en el mundo de la investigación gracias a su ciclo reproductivo. Al igual que el hombre, este animal tiene un ciclo de ovulación largo y espontáneo y posee un cuerpo lúteo secretor activo. Son más fáciles de alojar y más baratos que los modelos más grandes. Por su tamaño, es posible el estudio de prótesis humanas y la obtención de muestras de sangre y biópsicas de tamaño grande.

Pero parece ser que la deficiencia estrogénica no tiene consecuencias sobre la masa ósea de estos animales, por lo que no se presentan como un modelo adecuado para el estudio de la osteoporosis (Newman *et al.*, 1995).

La introducción del **minicerdo** eliminó los problemas relacionados con el gran tamaño del cerdo de granja (Akahoshi *et al.*, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2003). Aunque son más caros, al tener menor tamaño también se necesita menos espacio para alojarlos y son más fáciles de manejar. Su metabolismo óseo, su ciclo reproductivo y su función gastrointestinal similares a las del hombre son características muy positivas a la hora de valorar este modelo animal, sin embargo, su coste y la dificultad de adquirirlos en algunas zonas se presentan como desventajas (Newman *et al.*, 1995).

El **gato** no se ha utilizado mucho en la investigación, sin embargo, es fácil inducir osteopenia en los gatos en crecimiento mediante dieta pobre en calcio o alta en fósforo, o tras una larga inmovilización. Son fáciles de manejar y de alojar.

En contra de este modelo, encontramos que no parece haber relación entre la ganancia de edad y la pérdida de hueso, ni entre la ovariectomía y las fracturas espontáneas, lo que invalida en parte a este animal como modelo de osteoporosis. No hay que olvidar tampoco el vínculo afectivo que se puede establecer con estos animales, ya que son usados como mascotas (Newman *et al.*, 1995).

El modelo canino presenta una ventaja importante y es que posee sistema haversiano del hueso cortical y remodelado de los huesos cortical y trabecular similar al humano. Los **perros** son menos caros que los monos, por ejemplo, y es más fácil trabajar con ellos. Además, al ser monogástricos, el estudio de la absorción de los fármacos se asemeja más al del humano que en otros modelos animales.

Sin embargo, las desventajas también son claras: la perra ovula sólo dos veces al año y la extirpación de los ovarios y el útero no parece suficiente para producir pérdida ósea ni causar la aparición de fracturas espontáneas. Finalmente, el vínculo emocional que une al hombre con el perro dificulta su utilización como modelo experimental (Newman *et al.*, 1995).

Hay pocos estudios que utilicen la **oveja** para el estudio de la osteopenia, y que aunque son más grandes que los animales vistos previamente, son muy dóciles y sufren menos estrés cuando están en grupo, pudiendo vivir al aire libre con una mínima supervisión, lo que también reduce costes, además, son animales fáciles de adquirir. La

disminución del volumen óseo en la cresta iliaca y en la mandíbula relacionada con la edad o con la ovariectomía se asemeja bastante a la que se produce en la osteoporosis postmenopáusica de la mujer, por lo que parece un modelo prometedor en este campo; además, los perfiles hormonales son muy similares a los del humano.

El modelo ovino ofrece muchas ventajas gracias a su gran tamaño y debido a sus características óseas, es un buen prototipo para el estudio de biomateriales y prótesis (Bellino 2000; Newman *et al.*, 1995), pero presenta una serie de desventajas importantes: en primer lugar parece ser que existen fluctuaciones en la masa ósea relacionadas con las estaciones del año; no poseen una etapa menopáusica donde se acelere la pérdida ósea, y para conseguir osteoporosis tras la ovariectomía se necesita un periodo de tiempo de entre 12 y 24 meses; por otro lado, debido a las diferencias tan grandes que existen entre su sistema gastrointestinal y el humano, el estudio de fármacos por vía oral no puede ser evaluado correctamente; también el metabolismo del fósforo es distinto y el hueso de la oveja joven es plexiforme y sólo se aprecia remodelación haversiana a partir de los 7-9 años. Parece un modelo prometedor, pero son necesarios más trabajos para determinar sus posibilidades (Turner 2001; Newman *et al.*, 1995).

El **hurón** es un modelo de osteoporosis relativamente nuevo. Posee sistema haversiano y presenta pérdida ósea en la tibia proximal tras la ovariectomía. Es fácil de alojar, pequeño y tiene ovulación con las estaciones. Son carnívoros, lo que afecta al estudio del metabolismo de los fármacos y son demasiado pequeños para el estudio de implantes en el hueso osteopénico (Turner 2001).

Los estudios de osteopenia en **primates** no humanos (Mann *et al.*, 1992) presentan muchas ventajas sobre otros modelos de osteoporosis, ya que los órganos internos del

mono son muy similares a los del hombre. El ciclo y los patrones hormonales de, por ejemplo, la mona macaco, son muy parecidos a los de la mujer. El hueso responde de forma similar al cese de la función ovárica (Newman *et al.*, 1995, Turner 2001). Sin embargo, la menopausia sucede pasados los veinte años, por lo que el animal experimental debe ser suficientemente mayor como para ser útil en el estudio de la osteoporosis, lo que es difícil y costoso. El pico de masa ósea no se alcanza hasta los 9 años en, por ejemplo, el mono *cynomolgus* (Chen *et al.*, 2000), por lo que los trabajos con monas ovariectomizadas no deberían realizarse antes de esta edad. Su adquisición, mantenimiento y manejo suelen ser complicados, y pueden ser transmisores de enfermedades al hombre (Turner, 2001). Las estipulaciones legales y medioambientales de alojamiento son otro factor a tener en cuenta. El mono debería usarse en este caso como último escalón antes de comenzar los ensayos clínicos en humanos.

Por todo lo dicho, hemos considerado que el modelo de coneja ovariectomizada más dieta hipocálcica presenta muchas ventajas con respecto a los otros prototipos experimentales: es un modelo de osteoporosis en un adulto, se puede conseguir una disminución significativa de la DMO en un periodo breve de tiempo, el conejo posee una masa ósea adecuada para la colocación de implantes dentales y este animal es fácil de obtener y de cuidar. A esto hay que sumar que es útil para investigar los agentes anabólicos ya que tiene un *turn over* óseo rápido con predominio del remodelado sobre el proceso de modelado (Castañeda *et al.*, 2006).

La osteoporosis se ha inducido en animales de laboratorio aplicando diferentes métodos: **administración de corticosteroides, denervación, inmovilización, ausencia de gravedad, y ovariectomía bilateral asociada o no a dieta hipocálcica** (Fujimoto *et al.*,

1998; Turner 2001; Mori *et al.*, 1997). Este último método es el que mejor reproduce la situación clínica de osteoporosis post-menopáusica y conlleva el desarrollo de una osteoporosis sistémica tanto en el esqueleto axial como en el periférico.

Los modelos animales de osteoporosis se pueden clasificar en dos grandes grupos (Fini *et al.*, 2004; Turner 2001; Newman *et al.*, 1995): aquellos en los que el mecanismo principal es el aumento de reabsorción, p.e. ovariectomía con o sin dieta hipocálcica (Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005; Mori *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2001, 2004; Newman *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 2005; Lugero 2000; Namkung-Matthai *et al.*, 2001;) y los modelos en los que el déficit de formación es lo que prevalece, p.e. administración de corticoides (Ortoft y Oxlund, 1996), animales seniles (Duarte *et al.*, 2005); o la combinación de ambos mecanismos (Castañeda *et al.*, 2006; Mann *et al.*, 1992; Duarte *et al.*, 2005).

La administración de corticosteroides y la ovariectomía son los principales modelos de osteoporosis experimental descritos en conejos (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Fujimoto *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005; Mori *et al.*, 1997), pero la inducción de la enfermedad mediante ovariectomía asociada a la dieta hipocálcica en conejos ha sido menos estudiada (Mori *et al.*, 1997; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005).

La disminución de las hormonas sexuales en la menopausia (fundamentalmente los estrógenos) alteran los reguladores naturales de la masa ósea. Los estrógenos actúan como mitógenos de los OB, aumentando la expresión de AP y de colágeno tipo I (Majeska *et al.*, 1994; Zang *et al.*, 1994) así como los receptores de vitamina D (Ettinger *et al.*, 1999), de GH (Ishibe *et al.*, 1995) y de progesterona (Slootweg *et al.*, 1997); modulan la respuesta a la PTH en las células osteoblásticas (Ernst *et al.*, 1989; Fukayama y Tashjian, 1989) y

aumentan la expresión de IGFBP4 y disminuyen su *breakdown* proteolítica. La acción de preservar hueso de los estrógenos es mediada fundamentalmente a través de los efectos sobre el número y la actividad de los OC (actividad resortiva *per se* y sobre la vida media de la célula). En los OC, los niveles de receptores estrogénicos son generalmente bajos, por lo que la disminución del número de OC está posiblemente modulada por la producción de citoquinas por parte de las células osteoclastogénicas en el microambiente óseo más que por efectos directos sobre los OC: p.e. la expresión de factor inhibidor de la osteoclastogénesis está inducida por estrógenos (Hofbauer *et al.*, 1999; Kong y Penninger, 2000). Sin embargo, en estudios *in vitro* sobre cultivos de OC se ha visto una disminución inducida por estrógenos en la expresión de mRNAs y en la secreción de varias enzimas lisosómicas (catepsinas L y K y β glucuronidasa) (Kremer *et al.*, 1995; Oursler *et al.*, 1993). Los cambios en la actividad osteoclástica están probablemente mediados vía apoptosis. En roedores OVX se ha demostrado un aumento en la proliferación y diferenciación de los precursores de OC (Jilka *et al.*, 1995 y 1992), aumento del número de células estromales/osteoblásticas (Jilka *et al.*, 19998; Kimble *et al.*, 1996) y disminución de la apoptosis osteoclástica. En mujeres postmenopáusicas se ha demostrado aumento en la producción de IL-1, GM-CSF y TNF- α y en ratones OVX se ha demostrado un aumento de IL-6 (Hughes *et al.*, 1996). Por tanto, la disminución o eliminación de la función ovárica lleva al declive de los niveles estrogénicos, por ello los animales OVX, en nuestro caso la coneja Nueva Zelanda, tienen alterados los reguladores de la masa ósea, provocando la pérdida de tejido óseo, que conlleva fragilidad ósea, artritis, fracturas, etc.

Para la medición de la DMO *in vivo* mediante DEXA hemos utilizado el aparato NORLAND XR-26 ® (versión 2.3).

La **medida de la densidad mineral ósea** mediante el análisis con absorciometría dual fotónica de rayos X (DEXA) es una herramienta de gran precisión superior a otros

procedimientos no invasivos basados en la atenuación de la emisión de rayos γ , rayos X o ultrasonidos cuantitativos (Guglielmi, 1995; Lang *et al.*, 1991; Faulkner *et al.*, 1991). Sin embargo, aunque ya están disponibles otros métodos capaces de realizar una reconstrucción tridimensional de los parámetros óseos, tales como la tomografía computarizada cuantitativa o tomografía computarizada microscópica, no están ampliamente disponibles y son necesarios más estudios sobre la determinación densitométrica en modelos animales, especialmente cuando se evalúan estructuras anatómicas complejas o nuevas áreas anatómicas tales como el hueso cortical y el subcondral (Schmidt *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2001; Veitch *et al.*, 2004). Estudios comparativos han demostrado una excelente correlación en las medidas *in vivo* e *in vitro* de la masa ósea entre las distintas generaciones de sistemas DEXA (Faulkner *et al.*, 1991, 1993; Dal Mas *et al.*, 2002), y en concreto mediante el densitómetro Norland XR-26 ® (versión 2.3) que se ha utilizado en nuestro trabajo (Hagiwara *et al.*, 1993; Sievänen *et al.*, 1994).

Otros trabajos también han utilizado este mismo aparato, o una versión mejorada (Norland XR-36; Sievänen *et al.*, 1994) en animales pequeños *in vitro*, como en fémur de rata (Petersen *et al.*, 2000; Hagiwara *et al.*, 1993) o en varias localizaciones del miembro posterior (Sievänen *et al.*, 1994). En los estudios *in vivo* con versiones mejoradas de este densitómetro se ha medido la DMO en espina lumbar y cuello femoral de monos (Hotchkiss, 1999) y en tibia y húmero de gallinas (Schreiweis *et al.*, 2003). No hemos encontrado autores que describan la utilización *in vivo* de este aparato en un modelo de osteoporosis experimental en coneja, aunque sí con otros densitómetros (Hologic: Castañeda *et al.*, 2006; Norris *et al.*, 2000; QDR-2000: Mori *et al.*, 1997). En nuestro estudio, las regiones escogidas para la medición de la densidad han sido columna cervical, calota y tibia, si bien, la columna lumbar es la localización anatómica habitual para la

medición de las variaciones de la DMO en los modelos experimentales de osteoporosis.

Este trabajo demuestra que la columna cervical y la calota pueden ser también regiones excelentes para este propósito. Aunque en la tibia no encontramos diferencias S.S., sí que se aprecia también una tendencia a disminuir la DMO ($p = 0,1$).

Por otro lado, existe una correlación estadísticamente significativa entre la diferencia de DMO antes y después de la OVX más dieta hipocálcica entre la calota y la columna ($p = 0,01$) y entre la columna y la tibia ($p = 0,19$). Estos datos sugieren que la disminución de densidad acontecida en la columna tras el tratamiento se correlaciona con la de la tibia. Castañeda *et al* (2006) en un modelo de osteoporosis experimental en coneja mediante OVX más corticoides, encontraron correlación de la DMO medida en columna, rodilla y hueso subcondral de tibia, pero no con la de hueso cortical de la metáfisis de la tibia. Probablemente el tipo de hueso de la calota de la coneja es más sensible a este procedimiento de OVX + dieta hipocálcica debido a las diferencias en composición y metabolismos de las regiones óseas estudiadas.

Serían necesarios más estudios basados en técnicas volumétricas o en TC microscópica, lo que ayudaría probablemente a aclarar la estructura ósea de la tibia, aunque algunos autores aconsejan precaución con estos nuevos métodos a la hora de valorar la densidad cortical del hueso metafisario (Veitch *et al.*, 2004) por posibles errores de medición.

El modelo de osteoporosis experimental ha sido muy útil para el estudio de la pérdida ósea postmenopáusica y para dilucidar el proceso de reparación alrededor de los implantes. La inserción de una fijación de titanio en la tibia de conejos es un modelo experimental validado, donde se ha estudiado la interfase hueso-implante, equiparando los resultados obtenidos con los de los implantes intraorales. En nuestro trabajo, para valorar si la presencia de osteoporosis (inducida por OVX + dieta hipocálcica) y la aplicación local de 2 U.I. de rhGH en el lecho quirúrgico del implante afectaban de alguna manera a la integración de las fijaciones roscadas de titanio con superficie tratada, se realizó un análisis histológico, histomorfométrico y densitométrico.

El **ANÁLISIS HISTOLÓGICO** muestra que la GH a las dosis utilizadas (2 U.I.) no parece modificar la respuesta en animales sanos, pero sí mejora la actividad ósea en el grupo osteoporótico, ya que, aunque se aprecia algo de reabsorción cortical, predomina la presencia de tejido neoformado con o sin osteoide alrededor del implante. En el grupo OVX-CONTROL, se observa menor crecimiento óseo periimplantario formado fundamentalmente por tejido no calcificado (osteoide) al compararlo con el grupo INTACTO-CONTROL.

Como ya se comentó ampliamente en la introducción, hoy en día está perfectamente documentado que la GH estimula directamente el crecimiento de muchos tejidos (Kassem *et al.*, 1993 y 1994; Russell y Spencer 1985; Barnard *et al.*, 1991; Isgaard *et al.*, 1986; Lewinson *et al.*, 1993; Maor *et al.*, 1989, Green *et al.*, 1985; Stracke *et al.*, 1984), fundamentalmente por el incremento del número de células (Kember y Walker, 1971).

En el hueso, estimula el crecimiento longitudinal de forma directa mediante la estimulación de los precondrocitos en la placa de crecimiento (Kassem *et al.*, 1994),

seguido de una expansión clonal causada tanto por la producción local de IGF-I inducida por GH (Kidder *et al*, 1997; Guler *et al.*, 1988; Russell y Spencer, 1985; Holder *et al.*, 1981), como por el aumento en los niveles circulantes de IGF inducidos por GH. La GH es el determinante más importante para producir la estimulación de las células progenitoras, aunque es posible que IGF-I pueda estimular de alguna manera también la célula progenitora.

In Vitro, induce directamente la formación de hueso (Maor *et al*, 1989), estimula la producción de IGF-I (Maor *et al*, 1989), incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina (Stracke *et al*, 1984), eleva la síntesis de DNA (Maor *et al*, 1989) y aumenta el tamaño del cartílago (Maor *et al*, 1989). Estimula la proliferación de los **osteoblastos** (Kassem *et al*, 1993, 1994; Kassem 1997; Sloatweg *et al*, 1988, 1997) y a veces las funciones diferenciales de estas células, interactuando con las células progenitoras (Kassem *et al*, 1994) e induciendo la expresión de IGF-I (efecto anabólico) en osteoblastos de roedores (Canalis *et al*, 1989; Mohan y Baylink, 1991), pero no está clara esta inducción en los osteoblastos humanos (Chenu *et al*, 1990; Kassem *et al*, 1993). La GH eleva el número de osteoclastos en el hueso metafisario de tibia de rata hipofisectomizada (Lewinson *et al*, 1993), que estimula la reabsorción ósea osteoclástica a través de la acción directa e indirecta sobre la diferenciación osteoclástica, y de forma indirecta sobre la activación de los osteoclastos maduros (Nishiyama *et al.*, 1996) y vía IGF-I e IL-6, sobre la formación osteoclástica (Stracke *et al.*, 1984; Nishiyama *et al.*, 1996; Saggese *et al.*, 1995, Mochizuki *et al.*, 1992, Jilka *et al.*, 1992).

In vivo, la administración sistémica de GH incrementa los niveles circulantes de otras hormonas que tienen influencia sobre el hueso (Goff *et al.*, 1990) y es capaz de estimular la formación ósea mediante la interacción directa con el hueso (Hedner *et al*, 1996; Saban *et al.*, 1996). En animales con GHD la administración de GH aumenta la

formación y la masa ósea (Wright *et al.*, 1995b; Martínez *et al.*, 1996) y en animales con secreción normal de la hormona del crecimiento se evidencia un incremento la masa ósea cortical mediante la inducción de la formación ósea subperióstica y se produce un incremento de la resistencia mecánica de todo el hueso (Jorgensen *et al.*, 1991; Andreassen *et al.*, 1995); ganan peso y se evidencia un aumento del *turn over* óseo (Turner, 1995). Resultados similares se hallan en animales OVX (Andreassen y Oxlund, 1996; Eschen y Anddreassen, 1995). En ratas (Bak *et al.*, 1990; Bak y Andreassen, 1991; Nielsen *et al.*, 1991) y en *minipigs* (Kolbeck *et al.*, 2003; Bail *et al.*, 2002) el tratamiento con GH favorece la formación del callo óseo de fracturas y la resistencia mecánica de los huesos en proceso de curación, mientras que en conejos (Brittberg *et al.*, 1997), la respuesta es mucho más débil.

Es bien sabido que la **hormona del crecimiento** tiene una gran importancia en el crecimiento longitudinal del hueso y que estimula la diferenciación y proliferación de los osteoblastos, pero sus efectos sobre la osteointegración de fijaciones de titanio en situaciones de osteopenia / osteoporosis está muy poco estudiada. La aplicación sistémica de la hormona se ha evaluado ampliamente tanto en animales (Bail *et al.*, 2002; Andreassen y Oxlund, 2000; Mosekilde *et al.*, 1998; Kidder *et al.*, 1997; Verhaeghe *et al.*, 1996; Ortoft y Oxlund, 1996; Mann *et al.*, 1992) como en humanos (Landin-Wilhelmsen *et al.*, 2003; Nilsson, 2000; Wüster *et al.*, 1998; Baum *et al.*, 1996; Thoren *et al.*, 1993) con resultados satisfactorios acelerando la curación de fracturas, distracción ósea, tanto en situaciones de osteopenia y osteoporosis como en déficits de GH.

Algunos autores encuentran mejoría con la aplicación de la GH en situaciones de osteopenia, como Kidder y colaboradores (1997), que al administrar conjuntamente estrógenos y GH subcutánea en ratas ovariectomizadas, observan que ambas hormonas

reducían la osteopenia producida en el hueso esponjoso, si bien el mecanismo de actuación era diferente.

En algunos modelos de rata con osteopenia inducida con glucocorticoides la GH no parece aumentar la masa ósea al administrarla junto con el corticoide, pero en el estudio de Ortoft y Oxlund (1996), los investigadores vieron que en el grupo que había sido tratado sólo con GH aparecía un marcado aumento de la formación ósea y de la mineralización de la superficie perióstica, así como un aumento de la masa cortical (Ortoft y Oxlund, 1996).

En situaciones de reparación ósea, como fracturas u osteotomías de defecto crítico, también la hormona del crecimiento tiene efectos positivos, como en el trabajo de Cacciafesta y colaboradores (2001), en donde se inyectaron 2,7 mg de rhGH/kg/día a ratas a las que se les había practicado un defecto crítico de 5 mm de diámetro en la calota de cada hueso parietal, cubiertos exo y endocranealmente con una membrana de e-PTFE. Los autores constataron a los 28 días mediante test biomecánico el aumento de carga crítica, fuerza crítica y absorción de energía en máxima carga de forma significativa, así como casi el doble de aumento de volumen de hueso neoformado (medido mediante micro-TC) en los defectos comparado con el grupo placebo (Cacciafesta *et al.*, 2001).

En el trabajo de Hedner y colaboradores (Hedner *et al.*, 1996), se aplicó hormona de crecimiento de forma sistémica mantenida e inyectada vía catéter conectado a una mini bomba osmótica, en la proximidad de defectos óseos practicados en mandíbula de rata y cubiertos con membrana de e-PTFE; los autores encontraron que se producía un incremento en la formación ósea en las ratas tratadas con GH local durante 4 semanas, por lo que concluyeron que esta hormona ejercía un efecto local directo, independiente de la IGF-I producida en el hígado, y sugerían que la rhGH podía ser utilizada para estimular la curación y formación óseas junto con membranas de e-PTFE.

En nuestro trabajo valoramos la **aplicación local** de hormona del crecimiento sobre el proceso de osteointegración de un implante de titanio roscado de superficie tratada en la tibia de conejas ovariectomizadas y sometidas a dieta hipocálcica (osteoporosis experimental) y en la tibia de conejas sanas.

La aplicación local de GH durante el acto operatorio incrementa la formación de tejido osteoide y el crecimiento óseo en modelos animales (Guicheux *et al.*, 1998; Downes *et al.*, 1990; Blom *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005). El “efecto impulso” de la aplicación de GH local produciría una aceleración inicial del remodelado intracortical, empezando por la reabsorción y continuando por la formación ósea. Puesto que la administración es en una única dosis, no habría que temer la aparición de ningún efecto secundario. Siguiendo el modelo planteado por Tresguerres y colaboradores (en el que se aplicaron 4 U.I. de rhGH localmente a láminas de titanio, o bien en otras ocasiones, a implantes roscados bicorticales), en el presente trabajo se optó por la utilización de **2 U.I. de rhGH** con implantes roscados monocorticales en un modelo de coneja osteoporótica para ver si la aplicación de la mitad de dosis de hormona y el usar una fijación de titanio más pequeña era capaz de producir los mismos efectos, o conllevaba resultados distintos.

Del mismo modo que estos autores (Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005) la aplicación local de GH liofilizada se efectúa directamente en el lecho del implante, empapándose con el coágulo sanguíneo. En la escasa literatura hallada sobre aplicación local de GH, ésta se efectúa mediante el uso de una bomba osmótica o mediante inyección local subcutánea (Andreassen y Oxlund, 2003; Hedner *et al.*, 1996; Theyse *et al.*, 2006; Hedner *et al.*, 1996); y cuando es utilizada con implantes, los autores consultados impregnan la superficie del implante, ya sea ésta de titanio o de cerámica, con la GH (Downes *et al.*, 1995; Guicheux *et al.*, 1998; Blom *et al.*, 1998;). Downes y *et al.*, utilizaron

un cemento de polimetilmetacrilato para la aplicación local, obteniendo buenos resultados, pero en su caso, no se utilizaban implantes (Downes *et al.*, 1990).

Andreassen y Oxlund inyectaron durante 14 días, 2 ó 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ de rhGH en la superficie de la diáfisis de tibias de ratas de diez meses de edad intactas y en proceso de curación de fractura (durante 21 días). Este último grupo fue dividido en dos subgrupos, un primer grupo en el que los animales fueron sacrificados a los 21 días, donde se encontró un incremento de la carga y fuerza óseas así como de las dimensiones y volumen del callo de fractura; y un segundo subgrupo en el que se sacrificó a las ratas a los 98 días, en el que se mantenía aumentada la capacidad de carga ósea, frente a control (Andreassen y Oxlund, 2003). En estos casos, no se utilizaron implantes, por lo que los resultados no son del todo comparables con los nuestros y además la dosis utilizada (2 ó 20 $\mu\text{g}/\text{día}$) es muy inferior a la empleada en nuestro experimento (2 U.I.= 0,65 mg).

Por otro lado, encontramos en la bibliografía varios autores con los que no coincidimos, que encuentran mejorías con GH en animales sanos, como Downes y colaboradores, que publicaron un trabajo en el que habían utilizado GH en un cemento de polimetilmetacrilato, colocado en fémures de conejos sanos utilizando la otra pata como control y donde observaron que, al mes, aparecía mayor porcentaje de tejido osteoide en la superficie de la zona tratada con la hormona frente a la zona control (sin GH) (Downes *et al.*, 1990). Si bien, en este caso no se utilizan fijaciones de titanio y los tiempos de estudio son diferentes; creemos que este experimento no está bien diseñado ya que la GH aplicada localmente también tiene efectos sistémicos, por lo que al ser el control el otro fémur, también estaría influido de alguna manera por la acción de la hormona.

En los trabajos llevados a cabo por Tresguerres y colaboradores (Tresguerres 1999; Tresguerres *et al.*, 2002; 2003; 2005) se desarrolló por primera vez y de forma más amplia la utilización de la hormona de crecimiento humana aplicada localmente en la colocación

de fijaciones de titanio. En el primer trabajo (Tresguerres 1999), la fase experimental constó de cinco estudios llevados a cabo en conejas jóvenes, conejas preseniles y conejas jóvenes a las que se les indujo osteoporosis experimental. En cuatro de los estudios se emplearon láminas de titanio y en el restante implantes roscados. La autora de este trabajo concluyó que los datos histológicos confirmaban que la administración local de la GH en el interior de osteotomías practicadas en las tibias de conejas jóvenes producía una estimulación de la osteogénesis a nivel perióstico y aceleraba el remodelado estimulando tanto la reabsorción como la formación en las primeras semanas, dando lugar a un hueso más irregular y a las seis semanas encontraba menos reabsorción que en el grupo control. En el modelo de osteoporosis experimental (ovariectomía más dieta hipocálcica) la administración de GH local favoreció la osteointegración transcortical, sin aumentar la reabsorción (resultados similares a los hallados en nuestro trabajo). En los animales adultos preseniles, la aplicación local de la hormona no favorecía la neoformación del callo perióstico ni la osteointegración, aunque observó que la laguna osteocitaria se agrandaba. En el estudio en mandíbula, se evidenciaron diferencias cualitativas en la respuesta del hueso membranoso, en función de un aumento del tejido mesenquimal, al compararlo con el grupo control (Tresguerres 1999).

Siguiendo la línea de estos estudios, en 2002 se publicó un trabajo en el que se constató que la aplicación local de 4 IU rhGH durante la colocación de fijaciones de titanio en tibia de conejas osteoporóticas mejoraba la reacción perióstica y transcortical y la mineralización del osteoide a las dos semanas de la cirugía, sin aumentar la reabsorción ósea (Tresguerres *et al.*, 2002).

También estos mismos efectos se hallaron en animales sanos (sin osteoporosis) al aplicar localmente 4 UI de rhGH en el lecho de colocación de implantes roscados en tibia de conejo (Tresguerres *et al.*, 2003; 2005). En cambio, nuestros resultados no arrojan

diferencias significativas, lo que podría ser debido a la menor dosis de GH utilizada y/o al potencial de crecimiento de estos animales jóvenes. En el estudio de las conejas osteoporóticas con y sin aplicación de GH, nuestros resultados sí son similares a los de esta autora.

En los trabajos ya citados de Guicheux (Guicheux *et al.*, 1998) y Downes (Downes *et al.*, 1990) donde se empleó GH local en implantes de cerámica de fosfato de calcio colocados en un cemento de polimetilmetacrilato como *carrier*, respectivamente, en fémures de conejos sanos, se encontraron incrementos significativos del crecimiento óseo y mayor porcentaje de tejido osteoide en la superficie de la zona tratada con la hormona frente a la zona control (sin GH).

En la bibliografía más reciente, se describe la aplicación de diversos *carriers* de otras sustancias distintas de GH, utilizadas en la curación de fracturas como hidrogeles de pegamento de fibrina, alginato o colágeno tipo I (Weinand *et al.*, 2007) o implantes recubiertos de poly (D, L-láctico) y de hidroxiapatita (Rocca *et al.*, 2002; Schmidmaier *et al.*, 2006) y embebidos en IGF-I, TGF- β_1 y BMP₂ (Schmidmaier *et al.*, 2006), así como terapia génica con vectores víricos para provocar la liberación local de factores de crecimiento (Ulrich-Vinther 2007). Estos autores han abierto las puertas a nuevas vías de investigación y a que en un futuro se pueda estudiar la posibilidad de utilizar alguno de estos vehículos para la GH.

También encontramos en la bibliografía una gran diversidad de artículos que tratan sobre la aplicación local de **diversas sustancias** para acelerar el proceso de curación de los defectos óseos y las fracturas, obteniéndose diversos resultados.

En humanos, la aplicación de fosfato tricálcico con rhPDGF en defectos periodontales eleva los niveles de VEGF en el fluido crevicular y de ICTP, sugiriendo un

aumento del *turn over* en los primeros estadios del proceso de reparación ($p < 0,02$) (Cooke *et al.*, 2006).

La BMP-7 o proteína osteogénica 1 (OP-1) en bomba de liberación local en tibias de conejo en contacto con tejido óseo y en presencia de factores adversos (partículas de polietileno y AINEs) mejora la formación local de hueso (Ma *et al.*, 2006), y vehiculizada por implantes de titanio recubiertos de apatita, favorece la osteointegración de implantes en defectos óseos en fémur de conejo (Zhang *et al.*, 2004).

Se sabe que la combinación de rhBMP-2 y una esponja de colágeno absorbente (ACS) induce la formación ósea en experimentos preclínicos y clínicos (Milovancev *et al.*, 2007; Glassman *et al.*, 2007, 2005; Singh *et al.*, 2006). En 2002, la rhBMP-2/ACS a una concentración de 1,5 mg/cc fue aprobada por la FDA (Infuse®, *Bone Graft, Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN*). En marzo de 2007, Infuse® fue aprobada por la FDA como alternativa a los injertos de hueso autógeno utilizados en las elevaciones sinusales y para aumento de cresta alveolar en defectos de extracciones (McKay *et al.*, 2007). Recientemente, un estudio ha revelado que la aplicación de un dominio de unión al colágeno a la rh-BMP2 mejora cuantitativa y cualitativamente la formación ósea en un modelo de defecto óseo en conejo (Chen *et al.*, 2007).

Asimismo, se ha descrito que los geles ricos en plaquetas, fuente de gran cantidad de factores de crecimiento, mejoran el callo de fractura en ratas diabéticas (Gandhi *et al.*, 2006).

El cemento de fosfato cálcico (Oda *et al.*, 2006), o el poliuretano con aceite de castor (Pereira-Júnior *et al.*, 2007) aplicados localmente para rellenar defectos óseos, disminuyen la formación de tejido fibroso y son biocompatibles, pero no pueden sustituir al injerto de hueso esponjoso.

El uso de bifosfonatos, sustancias que se han utilizado habitualmente para el tratamiento de la osteoporosis, es actualmente motivo de controversia, tras la publicación de varios casos de osteonecrosis avascular en pacientes tratados durante largos periodos de tiempo (Wang *et al.*, 2007) y se ha demostrado que el pamidronato, aplicado localmente en defectos óseos de calota de conejo, inhibe la curación ósea (Choi *et al.*, 2007), por tanto, la utilización de estas sustancias requiere un fino control de las dosis y del tiempo de aplicación, para conseguir óptimos resultados (Amanat *et al.*, 2007; Bagan *et al.*, 2005, 2006).

En cuanto al **tipo de implante** utilizado, hoy en día parece ampliamente aceptado por la comunidad científica la utilización de fijaciones de titanio roscadas, en vez de impactadas (Lugero *et al.*, 2000) para conseguir mejor osteointegración así como implantes de superficie tratada (Franchi *et al.*, 2007; Giavaresi *et al.*, 2004), como es el caso del utilizado en nuestro trabajo, que aumentan considerablemente la superficie de contacto con el hueso.

La **técnica de colocación** de los implantes empleada intenta reproducir lo más fielmente posible las condiciones que se dan en los maxilares humanos, evitando el contacto con el endostio del lado opuesto, ya que en otros trabajos donde el anclaje de las fijaciones es bicortical (Tresguerres *et al.*, 2005, 2003 y 2002; Tresguerres, 1999; Mori *et al.*, 1997), parece ser que la actividad ósea podría acelerarse en presencia de un estímulo como la cirugía o un traumatismo (Slotte *et al.*, 2003; Frost, 1986), por lo que hemos decidido colocar los implantes monocorticales (Rocca *et al.*, 2002), para evitar esta situación que podría alterar los resultados. Tampoco hemos considerado la opción de los implantes intramedulares (Clemente *et al.*, 2000), porque no reproducen fielmente la situación clínica de los maxilares (anclaje cortical y medular).

Con respecto a la **metodología** empleada para el estudio de la interfase hueso-implante, los nuevos procedimientos que permiten cortar a la vez metal y hueso sin decalcificar este último, como es la inclusión en metacrilato (Donath y Breuner, 1982) y el sistema de polimerización, corte y pulido de Exakt®, presentan evidentes ventajas frente a los métodos tradicionales de decalcificación e inclusión en parafina, en los que se desnaturalizaba el hueso, o los métodos de fractura (Clockie y Warshawsky, 1995) o de remoción electroquímica del implante (Björsten *et al*, 1990), inexactos y desmineralizantes, respectivamente. A pesar de todo, se deben tener en cuenta las dificultades técnicas que este método conlleva para no alterar la interfase hueso-implante y que a veces provocan artefactos, inherentes a la realización de la técnica. Las tinciones empleadas son las habituales en microscopía óptica.

El análisis de los datos derivados del **ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO** muestra que ni la OVX, ni la GH tienen efecto significativo en el porcentaje de osteointegración en la tibia de forma individual (tampoco el hecho de que se trate de la tibia derecha o izquierda), pero sí la tiene la **interacción de los factores OVX y GH** ($p < 0,01$) (Fig. 40), esto es, se tienen que dar los dos factores para que aparezcan resultados significativos, de tal modo que encontramos que:

- **no hay diferencias significativas en el *BIC* entre los grupos OVX e INTACTO**, pero
- **cuando no se suministra la hormona del crecimiento, el *BIC* disminuye en el grupo OVX**, frente al INTACTO (donde hay mayor *BIC*), de forma estadísticamente significativa; confirmando así que en la osteoporosis experimental hay una disminución del porcentaje de osteointegración alrededor de los implantes, cuando no se aplica GH.

- **y cuando se aplica GH, se produce una disminución del *BIC* en el grupo INTACTO y un aumento en el grupo OVX.** Lo que indica dos situaciones, por un lado que la hormona del crecimiento no tiene un efecto beneficioso sobre el *BIC* en situaciones de *turn over* normal (INTACTO) y que en cambio sí es beneficiosa en situaciones de *turn over* elevado, como es el caso de la osteoporosis experimental (OVX).

La OVX no produce diferencias SS en el *BIC* por sí sola

Cuando NO se aplica GH, el *BIC* disminuye en el grupo OVX

Es posible deducir que aunque la presencia de osteoporosis puede alterar los procesos reparativos alrededor de los implantes, la osteointegración se consigue incluso en presencia de esta patología.

Muchos autores encuentran alteraciones en el *BIC*, en los modelos osteoporóticos. Así, Duarte *et al.* (2005) al estudiar en ratas la influencia de la edad y de la osteoporosis experimental (OVX) en el hueso periimplantario de fijaciones roscadas colocadas en tibia, encontraron que el *BIC* se alteraba significativamente ($p < 0,05$) en las regiones de hueso trabecular en el grupo OVX, no encontrando diferencias entre los dos grupos en la zona de hueso cortical, concluyendo que la edad afectaba principalmente al hueso pre-existente mientras que la ovariectomía alteraba significativamente tanto el hueso pre-existente como el neo-formado, por tanto, la deficiencia estrogénica podría afectar a la curación ósea y a la densidad periimplantarias en ratas, especialmente en la zona de hueso esponjoso (Duarte *et al.*, 2003). También en tibias de ratas sometidas a ovariectomía y neurotomía se constató menor *BIC* en cilindros de Ti-6Al-4V que en las tibias control (Hayashi *et al.*, 1994). Utilizando implantes roscados de titanio Yamazaki *et al.* obtuvieron resultados similares (Yamazaki *et al.*, 1999). Fini y colaboradores (2000) implantaron clavos hechos de varios

materiales, entre otros de una aleación de titanio (Ti-6Al-4V: Ti) en la parte distal de fémures de ratas sanas y ovariectomizadas. El análisis histomorfométrico mostró que la tasa de osteointegración en el caso de la aleación de Ti era significativamente menor ($p < 0,001$) en el grupo OVX que en el control.

Por el contrario, estos mismos autores, en otros trabajos, no hallan resultados significativos, coincidiendo con los nuestros, aunque sí disminución en el grupo OVX, en el *BIC* con clavos de titanio insertados en ratas (Fini *et al.*, 2001; 1997). Otro trabajo afirma que a los treinta días de haber colocado el implante no se encontraron diferencias significativas en dos modelos distintos de osteoporosis en rata (con *turn over* alto y bajo) (Okamura *et al.*, 2004), achacando las variaciones precisamente a la diversidad de osteogénesis alrededor de los implantes. Parece que puede existir un posible efecto bifásico relacionado con la deficiencia hormonal estrogénica, que afectaría temporalmente al proceso de integración de los tejidos periimplantarios en los primeros estadios (a las 2 semanas) y que posteriormente, una vez establecido el proceso (a las 4 semanas), se podría encontrar integración funcional incluso en las ratas ovariectomizadas (Ozawa *et al.*, 2002). Por tanto, en función del momento del estudio, se podrían encontrar datos contradictorios. Por otro lado, la disparidad de resultados hallados en la literatura puede estar producida en parte por la dificultad de obtener medidas estandarizadas alrededor de los implantes (Ozawa *et al.*, 2002).

En el modelo osteoporótico de oveja, aunque se han llevado a cabo muy pocos trabajos con implantes de titanio, se obtienen resultados similares respecto a la disminución del *BIC* (Rocca *et al.*, 2001; 2002). Para evaluar la osteointegración de implantes de titanio roscados cubiertos o no de HA, Rocca y colaboradores utilizaron un modelo de oveja osteoporótica. A las 12 semanas de colocadas las fijaciones, se realizaron pruebas de extracción de torque e histomorfométricas (*BIC*) en los fémures y las tibias de

las ovejas. Encontraron diferencias S.S. en todos los parámetros con disminución del *BIC* en el grupo OVX. Los autores encontraron mejorías significativas al utilizar los implantes recubiertos de HA. Estos datos arrojan nuevas vías de investigación, ya que en un futuro, se podría observar el comportamiento de la osteointegración de estos implantes junto con la hormona de crecimiento.

Cuando se aplica la GH, se produce una disminución del *BIC* en el grupo INTACTO y aumento en el grupo OVX.

Volviendo al gráfico de la figura 40 (Fig. 40), se observa que la aplicación de las 2 U.I. de rhGH en el grupo OVX-GH, mejora sustancialmente el porcentaje de osteointegración, frente al INTACTO-GH ($p = 0,033$). Nuestros resultados confirman la hipótesis del **efecto beneficioso de la hormona del crecimiento en la interfase hueso-implante en los sujetos con osteoporosis experimental**. Este resultado se podría explicar por la mayor acción de la GH sobre aquellos huesos con un *turn over* elevado, frente a un hueso sano, no osteoporótico, en el que el *turn over* sería normal.

En la literatura, son muy escasos los artículos que abordan el uso **local** de la hormona del crecimiento.

Uno de los pocos trabajos encontrados en la bibliografía que utiliza un modelo animal con implantes más GH es el de Blom y colaboradores, que estudiaron el crecimiento óseo y el contacto con el hueso de implantes con distintos tratamientos de superficie (hidroxiapatita, fluorapatita, hidroxiapatita más calor e implantes sin tratar) impregnados la mitad de ellos con GH y colocados en la cortical femoral de cabras hembra, despreciando la zona en relación con el periostio. A las seis semanas de colocadas las fijaciones, se sacrificó a los animales y se procedió a la preparación y al estudio microscópico y de análisis digital de la imagen de las muestras. Los resultados mostraron que en los implantes con GH, el contacto y el crecimiento óseos disminuían, de forma

significativa en el caso de los implantes sin tratamiento de superficie. Los autores explican los resultados aparentemente contradictorios del comportamiento de la GH argumentando que posiblemente la concentración de GH fuese tan grande que hubiera podido provocar un efecto inhibitor sobre los osteoblastos (Blom *et al.*, 1998). Los datos de este trabajo se asemejan más a los obtenidos en nuestro estudio, ya que en uno de los grupos utilizan un implante con superficie sin tratar, encontrando también una disminución significativa del *BIC*, a pesar de que los animales fueron sacrificados a las 6 semanas.

Ya más recientemente, encontramos los trabajos llevados a cabo por Tresguerres y colaboradores (Tresguerres 1999; Tresguerres *et al.*, 2002; 2003; 2005) en los que tras la administración local de la GH en el interior de osteotomías practicadas en las tibias de conejas jóvenes encontraron que, en la 2ª semana, el índice de afinidad (porcentaje de osteointegración) era menor que en el grupo control. En el modelo de osteoporosis experimental (ovariectomía más dieta hipocálcica) la administración de GH local favoreció la osteointegración transcortical, sin aumentar la reabsorción (resultados similares a los hallados en nuestro trabajo). En los animales adultos preseniles, la aplicación local de la hormona no favorecía la osteointegración (Tresguerres 1999).

Siguiendo la línea de estos estudios, en 2002 se publicó un trabajo en el que se constató que la aplicación local de 4 IU rhGH, durante la colocación de fijaciones de titanio en tibia de conejas osteoporóticas, mejoraba la reacción perióstica y transcortical y la mineralización del osteoide a las dos semanas de aplicada, sin aumentar la reabsorción ósea (Tresguerres *et al.*, 2002), aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, quizá por el escaso tamaño de la muestra.

También estos mismos efectos se hallaron en animales sanos (sin osteoporosis) al aplicar localmente 4 UI de rhGH en el lecho de colocación de implantes roscados en tibia de conejo, con un aumento significativo ($P < .05$) del porcentaje de osteointegración a las 2

y 6 semanas (Tresguerres *et al.*, 2003; 2005), lo que no concuerda con nuestros resultados, ya que en el presente trabajo, a las 2 semanas hemos encontrado que en el grupo de conejas intactas, la aplicación de la hormona no mejora el porcentaje de osteointegración de los implantes. Puesto que nuestro protocolo de trabajo es similar al de este estudio, una posible explicación de estas discrepancias es el hecho de que los implantes de la investigación llevada a cabo por estos autores sean bicorticales, por lo que se produce la estimulación del periostio de la cortical opuesta, con el consiguiente incremento de formación de callo óseo, en contra de lo que sucede en el nuestro, que por ser monocorticales, sólo obtienen estimulación perióstica de la zona más cercana al implante. Por otro lado, es posible que en nuestro trabajo la cantidad utilizada de GH, 2 UI frente a las 4 UI usadas por ellos, no sea suficiente para conseguir la estimulación necesaria de nuevas trabéculas óseas.

No encontramos correspondencia con los resultados del trabajo publicado en 1998 por Guicheux y colaboradores (1998) que emplearon implantes de cerámica de fosfato de calcio de macroporo con cargas de hGH de 1, 10 y 100 µg., colocados en fémures de conejos sanos, con el fin de estudiar mediante microscopio electrónico y análisis de la imagen los efectos de la hormona del crecimiento sobre el crecimiento óseo y la reabsorción del material de cerámica empleado. Encontraron que la hGH producía un incremento significativo del crecimiento óseo y mejoraba la sustitución del biomaterial frente a los implantes control. Es posible que los implantes de titanio recubiertos de hidroxiapatita y cargados con GH produzcan más *BIC* que los de titanio aislado, lo que abre una posible nueva línea de investigación en este campo.

La mayoría de los trabajos consultados en la bibliografía sobre la aplicación de la hormona del crecimiento en estudios experimentales animales con osteopenia u osteoporosis utilizan ésta de forma **sistémica**, pero lamentablemente, ninguno estudia la inserción de estructuras de titanio.

Utilizando un modelo de rata ovariectomizada, Mosekilde y colaboradores demostraron que tras 3 meses de tratamiento con distintas cantidades de GH, la hormona fue capaz de revertir la pérdida ósea inducida por la osteoporosis en las vértebras, de forma dosis dependiente. En la diáfisis femoral, la GH incluso incrementó los valores de carga de forma significativa al compararlos con el grupo control o con el *sham*. Sin embargo, en la metáfisis distal del fémur, donde el hueso es más esponjoso, sólo se vieron efectos parciales del tratamiento. La dosis de 50 µg / kg peso/ día no tuvo influencia en ninguna de las medidas. Por tanto, los efectos del tratamiento con GH en la ovariectomía dependen del lugar donde se mida y de la cantidad de hueso perdido con anterioridad (Mosekilde *et al.*, 98).

Stenport y colaboradores (2001) investigaron si la aplicación continua y sistémica de hormona del crecimiento humana (hGH) a conejos sanos a los que se les había colocado un implante en la tibia, mejoraba la osteointegración de los mismos. Las conclusiones a las que llegaron es que a las 8 semanas de su colocación y de la aplicación de la hormona, no existían diferencias estadísticamente significativas en las medidas histomorfométricas (porcentaje de contacto hueso-implante y área ósea en todas las espiras y en las tres primeras espiras). Encontraron que la hormona presenta un efecto beneficioso inicial, pero que sin embargo, debido a la rápida formación de anticuerpos, no se podía saber si este efecto permanecería a lo largo del tiempo.

En nuestro trabajo no se ha estudiado la posible formación de anticuerpos, si bien no hemos observado reacciones inflamatorias ni aparición brusca de células multinucleadas, de todas formas, nuestros animales fueron sacrificados a las 2 semanas, lo que quizá constituya un periodo demasiado temprano para observar tales hechos.

El **ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO** muestra que la mayoría de los resultados significativos aparecen en la región definida como **IMPLANTE**, que es la más próxima a la herida quirúrgica y que incluye la fijación de titanio, pero puesto que el valor de la fijación debería ser igual en todos los casos, es posible que el método de medición DEXA utilizado no sea el más adecuado, por inexacto, para valorar implantes roscados tan pequeños en animales como el conejo, ya que la unidad más pequeña que se puede utilizar en el aparato Norland, puede que resulte demasiado grande para este tipo de fijaciones, por lo que se decidió prescindir de la región **IMPLANTE** y evaluar los resultados obtenidos en la región **ALREDEDOR** (que resta el contenido del implante de titanio).

En nuestro trabajo, al realizar la medición con **DEXA** de la **DMO** en las zonas **ALREDEDOR e IMPLANTE**, encontramos que el factor **OVX** por sí solo produce una **disminución** significativa ($p < 0,01$ y $p < 0,005$ respectivamente) de la densidad mineral ósea en las conejas osteoporóticas frente a las intactas, y una fuerte tendencia en la región **SUMA**. Así mismo, se aprecia una disminución significativa de la DMO en la **interacción de los tres factores (en este caso) (GH, OVX, y TIBIA)**, ($p = 0,001$ y $p = 0,003$).

Hay varios trabajos en la literatura realizados sobre conejas osteoporóticas que evalúan la densidad mineral ósea en relación con implantes de titanio (Fujimoto *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1997; Lugero *et al.*, 2000), pero que no utilizan hormona del crecimiento.

En el trabajo de Mori *et al* (1997) donde se utilizaron tres grupos de conejos (OVX, OVX + dieta hipocálcica y control), se colocaron implantes de titanio en la tibia de las conejas un mes tras la ovariectomía; se estudió en profundidad la interfase hueso-implante y se midió la DMO al mes, a los tres meses y a los 6 meses tras la ovariectomía. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos OVX y control, pero sí entre el

grupo OVX + dieta hipocálcica y control. Estos resultados son similares a los hallados por nosotros al desarrollar el modelo de osteoporosis experimental.

Fujimoto y colaboradores (1998) utilizaron un modelo de coneja osteoporótica secundaria a la administración de corticoides, donde colocaron implantes de titanio en mandíbula y tibia. Tres meses después, se sacrificó a los animales y se midió la densidad mineral ósea en el fémur y el torque necesario para extraer los implantes previamente colocados, encontrando una disminución significativa en el torque en la tibia de las conejas tratadas con prednisolona, que además se correlacionaba con una menor DMO del fémur. En la mandíbula no encontraron diferencias entre los dos grupos, por lo que concluyeron que la administración de corticoides debía tener menos efecto en la osteointegración de los implantes en la mandíbula que en el resto del esqueleto.

Lugero y colaboradores midieron el hueso neoformado y la DMO alrededor de dos tipos de fijaciones de titanio, roscadas y cilíndricas, colocadas en conejas osteoporóticas, y vieron que el volumen trabecular y la aposición ósea eran significativamente mayores en el grupo control que en los animales osteoporóticos. También constataron que alrededor de las fijaciones roscadas se formaba más hueso que alrededor de las cilíndricas (Lugero *et al.*, 2000).

También en los datos aportados por el estudio de Roca *et al* (2002) en ovejas ovariectomizadas en las que se estudiaron dos tipos de implantes de Ti6Al4V, unos cubiertos de HA y otros no, se reflejaban diferencias estadísticamente significativas en la DMO y en el CMO entre el grupo OVX y el control.

Clemente y colaboradores estudiaron la densidad ósea alrededor de implantes recubiertos de HA colocados en el canal medular de fémures de rata. Encontraron mayor densidad en el grupo control que en el OVX, siendo significativa en la zona de hueso

inmediatamente proximal al implante, pero no en la densidad total del fémur. (Clemente *et al.*, 2000).

Estos resultados se asemejan a los encontrados en nuestro trabajo, donde tampoco encontramos diferencias significativas en la región TOTAL de la tibia.

Con la aplicación de GH

En un trabajo realizado en ratas ovariectomizadas, comparando la aplicación de rhGH, rhIGF-I, estradiol o suero salino, los autores encontraron que el grupo tratado con una inyección subcutánea 75 µg/ día de rhGH durante 8 semanas la DMO de la metáfisis distal del fémur se mantuvo en los valores previos al tratamiento (medido con DEXA). El volumen de las trabéculas óseas en la metáfisis tibial fue mayor que en el grupo tratado con suero salino y más evidente en la esponjosa primaria. La DMO en la diáfisis femoral fue 12-14% mayor ($p < 0.001$) tras 8 semanas de tratamiento con GH comparado con los grupos control. Es decir, que la GH en ratas OVX previno la pérdida de masa ósea y de fuerza en el hueso trabecular, aumentando la masa de hueso cortical por encima de los valores pretratamiento (Verhaeghe *et al.*, 1996), a pesar de que la dosis de GH utilizada era baja.

Tresguerres y colaboradores, en el modelo de osteoporosis experimental (ovariectomía más dieta hipocálcica) observaron menor densidad ósea *in vitro* en el grupo ovariectomizado (Tresguerres 1999; 2002), pero los resultados no fueron estadísticamente significativos.

En nuestro estudio, al realizar la medición de la **DMO** mediante DEXA en la coneja Nueva Zelanda se observa que el **factor GH**, por sí solo, **no produce diferencias estadísticamente significativas**, y la densidad es algo menor en el grupo tratado con GH. Esto parece explicarse por el propio mecanismo de actuación de la hormona que favorece

primero la reabsorción (Nishiyama *et al.*, 1996), lo que se traduciría en una disminución de la densidad en los primeros estadios de su aplicación, por lo que posiblemente sería necesario más tiempo para observar un aumento de la DMO. Como ya se ha comentado anteriormente, parece ser que la hormona del crecimiento, puesto que activa el remodelado, produciría primero una disminución de la densidad, en las primeras etapas del tratamiento (aunque haya aumento del tejido osteoide), como es nuestro caso (15 días), necesitándose un tratamiento a más largo plazo para ver cambios positivos en la DMO, cuando se deposita el calcio. Sí hay una fuerte tendencia al aumento del área cuando se aplica GH, lo que también explica la disminución de la DMO y el propio mecanismo de acción de la hormona. En cualquier caso, puede que el tamaño de la muestra sea pequeño y que sean necesarios más trabajos para poder dilucidar este punto, o que, como ya se ha comentado anteriormente, el método de medición DEXA no sea adecuado para este tipo de implante.

En cuanto a la DMO, Tresgueres y colaboradores tampoco encontraron resultados significativos de la hormona en coneja Nueva Zelanda, lo que sí coincide con nuestros resultados (Tresgueres *et al.*, 2005), aunque ellos sí apreciaron una tendencia al aumento de DMO en el grupo GH, posiblemente achacable de nuevo a la estimulación bicortical de las fijaciones (Tresgueres 1999; Tresgueres *et al.*, 2002; 2003; 2005).

En los animales sanos (sin osteoporosis) al aplicar localmente 4 UI de rhGH en el lecho de colocación de implantes roscados en tibia de conejo, a las 2 y 6 semanas (Tresgueres *et al.*, 2003; 2005) observaron una tendencia al aumento del área ósea y una disminución de la densidad mineral ósea, al igual que ocurre en este trabajo.

Cuando la aplicación de la GH es **sistémica** en animales de experimentación, los resultados del DEXA encontrados son similares (no significativos), si bien destacamos de

nuevo que no hemos hallado bibliografía en la que se aplique la GH sistémica y se utilice a la vez algún tipo de estructura de titanio intraósea por lo que los autores no investigan ni el porcentaje de osteointegración ni la DMO alrededor del implante. En el trabajo de Mann *et al.* (1992) se estudió el efecto sistémico de la rhGH en un grupo de monas que habían sido sometidas primero, a una dieta rica en calcio durante 5 meses, y después sustituida por una dieta hipocálcica a lo largo del tratamiento, y durante 5 meses tras la aplicación del mismo. Al pasar a esta dieta pobre en calcio, los animales se asignaron aleatoriamente a tres grupos: en el primero se utilizó un placebo; en el segundo se les administró 25µg diarios de un agonista de GnRH (GnRH-Ag), por lo que se convirtieron en macacas hipogonadales, y en el tercer grupo, se suministró el GnRH-Ag más una inyección i.m. de 100 µg /peso de GH tres veces por semana. El tratamiento duró 10 meses. Se observó una disminución de la DMO en la columna lumbar a los 6 meses del tratamiento y durante tres meses después de dejarlo, en el grupo GnRH-Ag, sin embargo, la DMO no varió de forma significativa en el grupo que recibió el suplemento de GH (Mann *et al.*, 1992).

Se consigue un aumento de la longitud, el área y el volumen, es decir, del tamaño óseo, en ratas en crecimiento tras aplicarles hGH durante 4 semanas, si bien la DMO disminuye, medida con DEXA y con pQCT (Rosen *et al.*, 1995), al igual que ocurre en nuestro trabajo.

En el estudio de Wright y colaboradores, no se encontraron diferencias en cuanto a volumen óseo en las ratas enanas dw/dw tratadas con GH en comparación con los animales normales, mientras que sí se encontró una disminución en la densidad mineral ósea y un aumento en la fosfatasa alcalina sérica (Wright *et al.*, 1995 b). En otro trabajo también aparece un incremento de la formación de hueso perióstico y de la deposición de colágeno y una ligera disminución del DMO (Martínez *et al.*, 1996), coincidiendo con nuestros datos.

En **humanos**, la aplicación de GH activa las unidades remodeladoras de hueso, aumentando la diferenciación de los osteoclastos y los osteoblastos, que una vez activadas, recorren un ciclo completo de “vida” (Wüster *et al.*, 1998). Cada unidad metabólica es responsable de la reabsorción y subsiguiente nueva síntesis de una cantidad específica de hueso. Cualquier aumento en el número de estas unidades activas simultáneamente en el esqueleto produce una disminución de la DMO y del CMO, debido al agrandamiento del llamado “espacio de remodelado óseo” e independiente del balance neto entre reabsorción y formación al final del ciclo de remodelado en cada unidad metabólica. Se sabe que el efecto del tratamiento con GH en adultos ejerce un efecto peculiar sobre el metabolismo óseo, no sólo acelera de forma marcada el *turn over* óseo a través del incremento de la activación de nuevas unidades metabólicas óseas, sino que también estimula la aposición ósea perióstica, que conlleva el agrandamiento de la anchura ósea. La combinación de estos dos efectos distintos pueden, de forma simultánea, aumentar tanto el contenido mineral óseo como el área de proyección del hueso, lo que se traduce en cambios en la DMO que son menos marcados que los cambios totales del contenido mineral óseo. Por la misma razón, cuando decrece el *turn over* óseo (p.e. tras la administración de bifosfonatos), disminuye el espacio de remodelado, lo que lleva a un incremento del CMO y de la DMO (Ortolani, 2000).

Corroborando estos hechos, encontramos el trabajo de Cuttica y colaboradores, donde tras 6 meses de administración subcutánea de 2 UI de rhGH a sujetos sanos mayores no encontraron mejoría en la densidad mineral ósea, aunque sí aumento de peso, disminución de la grasa corporal, mejoría de la fuerza muscular y aumento de los marcadores de reabsorción y formación ósea, así como aumento de los niveles sanguíneos de IGF-I (Cuttica *et al.*, 1997).

En diversos estudios se ha visto que tanto la reabsorción como la formación óseas estaban aumentadas en sujetos jóvenes sanos (Brixen *et al.*, 1990, Marcus *et al.*, 1990), concluyendo que el tratamiento con GH activa las unidades remodeladoras de hueso.

En los trabajos revisados, tampoco hemos encontrado ningún análisis de la utilización conjunta de GH en sujetos osteoporóticos con algún tipo de superficie recubierta de titanio.

Ya en 1998, Wüster y colaboradores (1998) realizaron un trabajo de revisión sobre la aplicación de la GH en pacientes: sanos, con osteoporosis, en ancianos y en casos de deficiencia de GH -GHD- (en los que la masa ósea está disminuída). Vieron que tras administrar GH a los pacientes con GHD se producía un aumento del *turn over* y que la densidad mineral disminuía inicialmente, durante el primer año de tratamiento, debido al aumento del espacio de remodelado. En los pacientes con osteoporosis, el sistema GH/IGF-I estaba mal regulado, ya que la secrección de GH se hallaba disminuída, y se encontraron valores bajos de IGF-I y II e IGFBP-3 en mujeres con osteoporosis postmenopáusica en comparación con mujeres normales.

En los casos de panhipopituitarismo, tras el tratamiento con la hormona durante 2 años, aunque aumentaron los marcadores bioquímicos del *turn over* óseo, no se evidenciaron cambios correlativos en la DMO (Balducci *et al.*, 1995).

Landin-Wilhelmsen *et al* (2003) sí encontraron diferencias significativas en la DMO o en el CMO al finalizar el estudio con 80 mujeres osteoporóticas que habían recibido previamente THS, y a las que se les suministró durante 18 meses 1 u/día de GH, o 2,5 U/día, o placebo (todas recibieron calcio y vitamina D), aunque ni al principio ni a los 5 años de terminar el tratamiento, existían tales diferencias. Concluyeron que la GH producía un efecto tardío, prolongado y dosis dependiente en la osteoporosis

postmenopáusica y que podría ser usada como agente anabólico en el tratamiento de esta enfermedad.

También en niños prepúberes con GHD, tras doce meses de terapia con GH, se vio que la densidad cortical disminuía de forma significativa con respecto al comienzo del estudio, mientras que el área y el grosor corticales y medulares no variaron. Se explicaron estos hallazgos por el aumento de metabolismo óseo debido al tratamiento con la hormona, que hace que el hueso crezca muy rápidamente durante el primer mes, lo que lleva a una disminución de la densidad ósea por la formación de nuevo hueso sin mineralizar (Schweizer *et al.*, 2003).

Tampoco en el trabajo de Hansen y colaboradores (1996) se encontró mejoría significativa de la DMO tras 12 meses de terapia en adultos con GHD, es más, disminuyó significativamente la DMO total y la del radio.

En resumen, se observa que sólo en los estudios a largo plazo de 18 a 24 meses se evidencia un aumento neto de la DMO en humanos con GHD (Thoren *et al.*, 1993; Baum *et al.*, 1996; Nilsson, 2000).

Un hallazgo universal es que los niveles urinarios de los marcadores bioquímicos de remodelado aumentan al administrar GH de forma dosis dependiente. El CMO aumenta mucho más que la DMO (Nilsson, 2000).

Generalmente, los marcadores bioquímicos de la remodelación ósea aumentan, sin embargo, hoy en día no se pueden discutir los efectos sobre el metabolismo óseo de la administración de GH en humanos sin considerar la administración simultánea de esteroides sexuales y el nivel de secreción endógena de GH. Esta es la llave que explica las diferencias que aparecen en los efectos de la administración de GH en hombres mayores sanos con bajos niveles de IGF-I (Rudman *et al.*, 1990; Cuttita *et al.*, 1997) y en mujeres mayores sanas con y sin estrógenos pero con niveles de IGF-I normales (Holloway *et al.*,

1994; Ghiron *et al.*, 1995). Además, existen diferencias en función del género en cuanto a la respuesta a la terapia con GH se refiere, ya que las mujeres en general, tienen mayores niveles de secreción de GH, que decrecen con la edad (Eden Engstrom *et al.*, 2002), pero los valores de los marcadores séricos de IGF-I y de remodelado óseo son similares a los de los varones. Una posible explicación a este hecho es el patrón de esteroides, que es distinto en ambos sexos; se ha visto que las mujeres que toman estrógenos orales, necesitan mayor dosis de GH para alcanzar las mismas concentraciones en sangre de IGF-I (Cook *et al.*, 1999; Eden Engstrom *et al.*, 2000).

En general, la aplicación de la GH produce un incremento de la aposición perióstica (Andreassen y Oxlund, 2000). La combinación del incremento del depósito mineral y del crecimiento perióstico se traduciría en una mejoría importante de la fuerza ósea tras la terapia con la hormona, especialmente si se combina con antiresortivos. Este efecto también explicaría por qué existe una gran discrepancia entre los datos de la DMO medida con DEXA de los pacientes tratados con GH, y la posibilidad de que la rhGH pudiera tener un efecto más marcado en la reducción de fracturas del que puede ser explicado mediante la densitometría (Rosen y Wüster, 2003).

7. CONCLUSIONES

Por todo ello, llegamos a las siguientes CONCLUSIONES:

1. La osteoporosis experimental se induce en la coneja Nueva Zelanda de 6 meses mediante la combinación de ovariectomía y dieta hipocálcica de manera reproducible a las 7 semanas de aplicación del tratamiento; se constata una disminución de la DMO estadísticamente significativa en la calota y columna cervical.
2. Se demuestra la osteointegración de los implantes de titanio roscados en la tibia en el modelo de osteoporosis experimental mediante técnicas histológicas y morfométricas.
3. En el grupo de animales osteoporóticos, existe una disminución significativa de la DMO ($p = 0,01$) y el *BIC* es más pobre que en el grupo de animales no osteoporóticos.
4. La aplicación de rhGH en el grupo de animales no osteoporóticos no mejora el *BIC* ni la DMO alrededor del implante.
5. En el modelo de osteoporosis experimental, la aplicación de 2 UI de rhGH en el lecho quirúrgico de colocación de un implante mejora significativamente el *BI+C* ($p < 0,01$) y la DMO ($p < 0,001$) alrededor de la fijación a los 15 días de su implantación.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aberg ND, Bryve KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:53-80. Review.
2. Agnosedì D, Crepaldi G, Isaia G, Mazzuoli G, Ortolani S, Passeri M, et al. A double blind, placebo-controlled trial of ipriflavone for prevention of postmenopausal spinal bone loss. *Calcif Tissue Int*. 1997;61:142-7.
3. Akahoshi S, Sakai A, Arita S, Ikeda S, Morishita Y, Tsutsumi H, Ito M, Shiraishi A, Nakamura T. Modulation of bone turnover by alfacalcidol and/or alendronate does not prevent glucocorticoid-induced osteoporosis in growing minipigs. *J Bone Miner Metab*. 2005;23:341-50.
4. Akiyama T, Miyazaki T, Bouillet P, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. In vitro and in vivo assays for osteoclast apoptosis. *Biol Proced Online*. 2005;7:48-59.
5. Albertazzi P, Di Micro R, Zanardi E. Tibolone: a review. *Maturitas*. 1998;30:295-305.
6. Alexandersen P, Toussaint A, Christiansen C, Devogelaer JP, Roux C, Fechtenbaum J, et al. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;285:1482-8.
7. Altman A, Hochberg Z, Silbermann M. Interactions between growth hormone and dexamethasone in skeletal growth and bone structure of the young mouse. *Calcif Tissue Int*. 1992;51:298-304.
8. Items 1 - 20 of 22Page of 2Next
9. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res*. 2007;22:867-76.
10. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, Dubese RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T -cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390:175-9.
11. Anderson JJ, Chen X, Boass A, Symons M, Kohlmeier M, Renner JB, Garner SC. Soy isoflavones: no effects on bone mineral content and bone mineral density in healthy, menstruating young adult women after one year. *J Am Coll Nutr*. 2002;21:388-93.
12. Andreassen TT, Jorgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1057-67.
13. Andreassen TT, Oxlund H. Additive anabolic effects of growth hormone and parathyroid hormone on vertebral body cortical and cancellous bone in old ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1996;11 Suppl 1:S457-60.
14. Andreassen TT, Oxlund H. Local anabolic effects of growth hormone on intact bone and healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int*. 2003;73:258-64.
15. Andreassen TT, Oxlund H. The influence of combined parathyroid hormone and growth hormone treatment on cortical bone in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2000;15:2266-75.
16. Ang ES, Zhang P, Steer JH, Tan JW, Yip K, Zheng MH, Joyce DA, Xu J. Calcium/calmodulin-dependent kinase activity is required for efficient induction of osteoclast differentiation and bone resorption by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL). *J Cell Physiol*. 2007;212:787-95.
17. Arjmandi BH, Birnbaum RS, Juma S, Barengolts E, Kukreja SC. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanisms. *Calcif Tissue Int*. 2000;66:61-5.
18. Backeljauw PF, Underwood LE. Prolonged treatment with recombinant insulin-like growth factor-I in children with growth hormone insensitivity syndrome--a clinical research center study. GHIS Collaborative Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:3312-7.
19. Backeljauw PF, Underwood LE; GHIS Collaborative Group. Growth hormone insensitivity syndrome. Therapy for 6.5-7.5 years with recombinant insulin-like growth factor I in children with growth hormone insensitivity syndrome: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1504-10.
20. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, Diaz JM, Scully C. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol*. 2006;42:327-9. Epub 2005 Nov 4. Review.
21. Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, Poveda R, Milian MA, Sanchis JM, Silvestre FJ, Scully C. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:120-3. Review.
22. Bagi CM, DeLeon E, Brommage R, Adams S, Rosen D, Sommer A. Systemic administration of rhIGF-I or rhIGF-I/IGFBP-3 increases cortical bone and lean body mass in ovariectomized rats. *Bone*. 1995;16(4 Suppl):263S-269S.
23. Bail HJ, Kolbeck S, Krummrey G, Schmidmaier G, Haas NP, Raschke MJ. Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing. *Horm Res*. 2002;58 Suppl 3:39-42.
24. Bak B, Andreassen TT. The effect of growth hormone on fracture healing in old rats. *Bone*. 1991;12:151-4.
25. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone*. 1990;11:233-9.
26. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop*. 1991;264:295-301.
27. Baker AR, Hollingshead PG, Pitts-Meek S, Hansen S, Taylor R, Stewart TA. Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 1992;12:5541-7.
28. Balducci R, Toscano V, Pasquino AM, Mangiantini A, Municchi G, Armenise P, Terracina S, Prossomariti G, Boscherini B. Bone turnover and bone mineral density in young adult patients with panhypopituitarism before and after long-term growth hormone therapy. *Eur J Endocrinol*. 1995;132:42-6.
29. Barnard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology*. 1991;128:1459-64.
30. Baum HB, Biller BM, Finkelstein JS, Cannistraro KB, Oppenheim DS, Schoenfeld DA, Michel TH, Wittink H, Klibanski A. Effects of physiologic growth hormone therapy on bone density and body composition in patients with adult-onset growth hormone deficiency. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 1996;125:883-90.
31. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res*. 1993;8 Suppl 2:S565-72.
32. Behringer RR, Lewin TM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL, D'Ercole AJ. Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology*. 1990;127:1033-40.
33. Bellino FL. Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause*. 2000;7:14-24.
34. Bengtsson BA, Eden S, Lonn L, Kvist H, Stokland A, Lindstedt G, Bosaeus I, Tolli J, Sjöström L, Isaksson OG. Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Feb;76:309-17.

35. Bengtsson BA, Johannsson G. The use of growth hormone in adults: a review of the last 10 years, the present and a perspective for the future. *Growth Horm IGF Res.* 1998;8 Suppl B:27-35. Review.
36. Benito López P, Corpas Jiménez MS. Efectos metabólicos de la administración de hormona de crecimiento. *Endocrinología.* 1991;38:247-53.
37. Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373:231-41.
38. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature.* 1986;319:516-8.
39. Beshyah SA, Kyd P, Thomas E, Fairney A, Johnston DG. The effects of prolonged growth hormone replacement on bone metabolism and bone mineral density in hypopituitary adults. *Clin Endocrinol.* 1995;42:249-54.
40. Beshyah SA, Shahi M, Skinner E, Sharp P, Foale R, Johnston DG. Cardiovascular effects of growth hormone replacement therapy in hypopituitary adults. *Eur J Endocrinol.* 1994;130:451-8.
41. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105:1663-8.
42. Bikle DD, Harris J, Halloran BP, Currier PA, Tanner S, Morey-Holton E. The molecular response of bone to growth hormone during skeletal unloading: regional differences. *Endocrinology.* 1995;136:2099-109.
43. Bikle DD, Sakata T, Halloran BP. The impact of skeletal unloading on bone formation. *Gravit Space Biol Bull.* 2003;16:45-54.
44. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press Inc;1996.
45. Bjursten LM, Emanuelson L, Ericson LE, Thomsen P. Method for ultrastructural studies of the intact tissue-metal interface. *Biomaterials.* 1990;11:596-601.
46. Blom EJ, Verheij JG, de Bleeck-Hogervorst JM, Di Silvio L, Klein CP. Cortical bone ingrowth in growth hormone-loaded grooved implants with calcium phosphate coatings in goat femurs. *Biomaterials.* 1998;19:263-70.
47. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Basle MJ, Chappard D. Bone loss and teeth. *Joint Bone Spine.* 2005;72:215-21.
48. Bogazzi F, Cosci C, Sardella C, Martino E, Gasperi M. Acromegaly: effects on bone metabolism and mass. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(10 Suppl):33-5.
49. Bohlooly-Y M, Olsson B, Bruder CE, Linden D, Sjogren K, Bjursell M, Eggecioglu E, Svensson L, Brodin P, Waterton JC, Isaksson OG, Sundler F, Ahren B, Ohlsson C, Oscarsson J, Tornell J. Growth hormone overexpression in the central nervous system results in hyperphagia-induced obesity associated with insulin resistance and dyslipidemia. *Diabetes.* 2005;54:51-62.
50. Bolanowski M, Daroszewski J, Medras M, Zadrozna-Sliwka B. Bone mineral density and turnover in patients with acromegaly in relation to sex, disease activity, and gonadal function. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:72-8.
51. Bonewald LF. Transforming growth factor-beta. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology.* San Diego, CA: Academic; 1996. p. 647-59.
52. Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. *Bone.* 1996;19:35-40.
53. Bord S, Ireland DC, Moffatt P, Thomas GP, Compston JE. Characterization of Osteoclin Expression in Human Bone. *J Histochem Cytochem.* 2005;27.D0I: 10.1369/jhc.4C6561. 2005.
54. Bostrom MPG, Lane JM, Berberian WS, Missri AAE, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM. Immunolocalization and expresion of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in fractures healing. *J Orthop Res.* 1995;13:357-67.
55. Bouillon R: Growth hormone and bone. *Horm Res.* 1991;36(suppl 1):49-55.
56. Boyce BF, Aufdemorte TB, Garret IR, Yates AJP, Mundy GR. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology.* 1989;125:1142-50.
57. Bravenboer N, Holzmann P, de Boer H, Roos JC, Van der Veen EA, Lips P. The effect of growth hormone on histomorphometric indices of bone structure and bone turnover in GH-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1818-22.
58. Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials.* 1997;18:235-42.
59. Brixen K, Kassem M, Eriksen EF, Nielsen HK, Flyvbjerg A, Mosekilde L. Growth hormone and adult bone remodeling: The potential use of GH in the treatment of osteoporosis. *J Pediatr Endocrinol.* 1993;6:65-71.
60. Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, Flyvbjerg A. A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. *J Bone Miner Res.* 1990;5:609-18.
61. Burdet L, de Murali B, Schutz Y, Pichard C, Fitting JW. Administration of growth hormone to underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, randomized, controlled study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1800-6.
62. Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone—their role in mechanotransduction. *J Nutr.* 1995;125 Suppl 7: S2020-3.
63. Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen TT. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *Eur J Orthod.* 2001;23:733-40.
64. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor-I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone culture. *J Clin Invest.* 1989;83:60-5.
65. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest.* 1988;81:1572-7.
66. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu Rev Med.* 1991;42:17-24.
67. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1989;18:903-18.
68. Canalis E. Skeletal growth factors. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis.* San Diego, CA: Academic; 1996. p. 261-79.
69. Cao T, Shiota T, Ohno K, Michi K. Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. *J Periodontal Res.* 2004;39:37-41.
70. Cao T, Shiota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi K. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Impl Res.* 2001;12:604-8.
71. Carlsson GE, Persson G. Morphologic changes of the mandible after extraction and wearing of dentures. A longitudinal, clinical, and x-ray cephalometric study covering 5 years. *Odontol Revy.* 1967;18:27-54. En: Mich CE. *Prótesis dental sobre implantes.* Elsevier España, S.A. 2006, Ed. En Español. Madrid. P:1-17.

72. Carmeliet G, Van Cromphaut S, Daci E, Maes C, Bouillon R. Disorders of calcium homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17:529-46.
73. Carrascosa A, Audi L. El cartilago de crecimiento. Regulación hormonal de su diferenciación. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. Retrasos del crecimiento. 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos SA; 1996. p. 119-26.
74. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanes F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.* 2006;35:34-41.
75. Castillo C, Cruzado M, Ariznavarreta C, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Cachofeiro V, Tresguerres JA. Effect of recombinant human growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old male Wistar rats. *Biogerontology.* 2005;6:303-12.
76. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev.* 1994;15:27-39.
77. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblasts enriched cultures from fetal rat parietal bone. *Endocrinology.* 1989;125:13-9.
78. Cheifetz S, Like G, and Massague J. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1986;261:9972-8.
79. Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007;28:1027-35. Epub 2006 Nov 13.
80. Chen Y, Shimizu M, Sato K, Koto M, Tsunemi K, Yoshida T, Yoshikawa Y. Effects of aging on bone mineral content and bone biomarkers in female cynomolgus monkeys. *Exp. Anim.* 2000;49:163-70.
81. Chen YM, Ho SC, Lam SS, Ho SS, Woo JL. Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4740-7.
82. Chenu C, Valentin-Opran A, Chavassieux P, Saez S, Meunier PJ, Delmas PD. Insulin-like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)₂ D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone.* 1990;11:81-6.
83. Chihara K, Sugimoto T. The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res.* 1997;48 Suppl 5:S45-9.
84. Chipman JJ, Zerwekh J, Nicari M, Marks J, Pak CJC. Effect of growth hormone administration: Reciprocal changes in serum 1a,25-dihydroxy-vitamin D and intestinal calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:321-4.
85. Choi JY, Kim HJ, Lee YC, Cho BO, Seong HS, Cho M, Kim SG. Inhibition of bone healing by pamidronate in calvarial bony defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:321-8. Epub 2006 Oct 27.
86. Chow J, Lean JM, Chambers TJ. 17β-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology.* 1992;130:3025-32.
87. Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest.* 1992;89:74-8.
88. Chu LW, Lam KS, Tam SC, Hu WJ, Hui SL, Chiu A, Chiu KC, Ng P. A randomized controlled trial of low-dose recombinant human growth hormone in the treatment of malnourished elderly medical patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1913-20.
89. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest.* 1993;91:1888-96.
90. Clemente C, Tabuenca r, Rodríguez-Torres R, Fernández-Valencia R, Carrascosa-Sánchez J, Gómez-Pellico L. Influence of osteoporosis on osseointegration: an experimental study. *Eur J Anat.* 2000;4:61-7.
91. Clockie CML, Warshawsky H. Development of a rat tibia model for morphological studies of the interface between bone and a titanium implant. *Compendium.* 1995;16:56-66.
92. Cobo T, Hernández A, Torrijos A. Técnicas para la valoración de la masa ósea en la osteoporosis. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento. Madrid: Médica Panamericana; 2003. p. 31- 40.
93. Compston JE, Mellish RWE, Garrahan NJ, Croucher PI. Structural mechanisms of trabecular bone loss in man. *Bone Miner.* 1989;6:339-50.
94. Compston JE, Mellish RWE, Garrahan NJ, Croucher PI. Structural mechanisms of trabecular bone loss in normal subjects. In: Takahashi HE, ed. Bone Morphometry. Proceedings of the Fifth, International Congress on Bone Morphometry. Tokyo: Nishimura; 1990. p. 371-4.
95. Compston JE. Histomorphometric manifestations of age-related bone loss. In: Rosen C, Glowacki J, Bilezikian J, eds. The Aging Skeleton. San Diego, CA: Academic; 1999. p. 251-61.
96. Compston JE. Sex Steroids and Bone. *Physiol Rev.* 2001;81:419-47.
97. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop.* 1995;313:8-18.
98. Conover CA. The role of insulin-like growth factors and binding proteins in bone cell physiology. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego, CA: Academic; 1996. p. 607-18.
99. Cook DM, Ludlam WH, Cook MB. Route of estrogen administration helps to determine growth hormone (GH) replacement dose in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3956-60.
100. Cooke JW, Sarment DP, Whitesman LA, Miller SE, Jin Q, Lynch SE, Giannobile WV. Effect of rhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. *Tissue Eng.* 2006;12:1441-50.
101. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Señaris R, Devesa J, Arce VM. Activation of Growth Hormone Receptor delivers an antiapoptotic signal: Evidence for a role of Akt in this pathway. *Endocrinology.* 1999;140:5937-43.
102. Costoya JA, Ríos R, García-Barros M, Gallego R, García-Caballero T, Senaris R, Arce VM, Devesa J. Role of growth hormone receptor in HL-60 cell survival. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;4:26-31.
103. Cranney A, Guyatt G, Griffith L, Wells G, Tugwell P, Rosen C, the Osteoporosis Methodology Group, and the Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IX: Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev.* 2002;23:570-8.
104. Cummings SR. LIFT study is discontinued. *BMJ.* 2006;332:667.
105. Cuneo RC, Salomon F, Wilmhurst P, Byrne C, Wiles CM, Hesp R. Cardiovascular effects of growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults: stimulation of the renin-aldosterone system. *Clin Sci.* 1991;81:587-92.
106. Cuttica CM, Castoldi L, Gorrini GP, Peluffo F, Delitala G, Filippa P, Fanciulli G, Giusti M. Effects of six-month administration of recombinant human growth hormone to healthy elderly subjects. *Aging (Milano).* 1997;9:193-7.
107. Dal Mas I, Biscardi A, Ripamonti U. Comparison of two Hologic DXA systems (QDR 1000 and QDR 4500/A) for in vivo bone mass measurement in the baboon (*Papio ursinus*). *J Clin Densitom.* 2002;5:313-8.

108. Dao TT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants?. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8:137-44.
109. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*. 1989;10:68-91.
110. Davis JE, ed. Bone engineering. Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
111. de la Mata J, Uy H, Guise TA, Story B, BBF, Mundy GR, Roodman GD. Il-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by PTH-rP in vivo. *J Clin Invest*. 1995;95:2846-52.
112. De Souza MJ, Miller BE, Sequenzia LC, Luciano AA, Ulreich S, Stier S, Prestwood K, and Lasley BL. Bone health is not affected by luteal phase abnormalities and decreased ovarian progesterone production in female runners. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2867-76.
113. Dedhar S, Gaboury L, Galloway P, Eaves C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origino. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:9253-7.
114. Degerblad M, Bengtsson BA, Bramnert M, Johnell O, Manhem P, Rosen T, Thoren M. Reduced bone mineral density in adults with GH deficiency: Increase bone turnover during 12 months of GH substitution therapy. *Eur J Endocrinol*. 1995;133:180-8.
115. Degerblad M, Elgindy N, Hall K, Sjoberg HE, Thoren M. Potent effect of recombinant growth hormone on bone mineral density and body composition in adults with panhypopituitarism. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1992;126:387-93.
116. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:92-102. Review.
117. Devesa J, Barros MG, Gondar M, Tresguerres JA, Arce V. Regulation of hypothalamic somatostatin by glucocorticoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53:227-82.
118. Devesa J, Esquifino A, Tresguerres JAF. Hormonas adenohipofisarias. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 1992. p. 913-27.
119. Devesa J, García Barros M, Costoya JA, Gondar M, Gavrilina T, Gavrilin M, Arce V. Expresión de los genes de hormona de crecimiento, variantes moleculares y acciones biológicas de estas variantes. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. *Retrasos del crecimiento*. 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos S.A.; 1996. p. 29-44.
120. Devogelaer JP. A review of the effects of tibolone on the skeleton. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5:941-9.
121. Deyhim F, Smith BJ, Soung do Y, Juma S, Devareddy L, Arjmandi BH. Ipriflavone modulates IGF-I but is unable to restore bone in rats. *Phytother Res*. 2005;19:116-20.
122. Díaz MJ, Devesa J. Expresión del gen de hormona de crecimiento: variantes moleculares y actividad biológica de estas variantes. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. *Retrasos del crecimiento, fisiopatología*. Madrid: Díaz de Santos SA; 1992.p.17-34.
123. Dieguez C, Dominguez F, Casanueva F. Factores de crecimiento y oncogenes. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España;1992. p. 939-46.
124. Doga M, Bonadonna S, Gola M, Mazziotti G, Nuzzo M, Giustina A. GH deficiency in the adult and bone. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(8 Suppl):18-23. Review.
125. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Saege-Schiff technique. *J Oral Pathol*. 1982;11:318-20.
126. Downes S, Clifford CJ, Scotchford C, Klein CP. Comparison of the release of growth hormone from hydroxyapatite, heat-treated hydroxyapatite, and fluoroapatite coatings on titanium. *J Biomed Mater Res*. 1995;29:1053-60.
127. Downes S, Wood DJ, Malcolm AJ, Ali SY. Growth hormone in polymethylmethacrylate cement. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;252:294-8.
128. Duarte PM, Cesar Neto JB, Goncalves PF, Sallum EA, Nociti FH. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *Implant Dent*. 2003;12:340-6.
129. Duarte PM, Conclaves PF, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Age-related and surgically induced estrogen deficiencies may differently affect bone around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2005;76:1496-501.
130. Durham SK, Kiefer MC, Riggs BL, Conover CA. Regulation of insulin-like growth factor binding protein 4 proteinase in normal human osteoblast-like cells: implications in bone cell physiology. *J Bone Miner Res*. 1994;9:111-7.
131. Eckardt H, Bundgaard Kg, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hvid I. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. *J Orthop Res*. 2003;21:335-40.
132. Eden Engstrom B, Burman P, Johansson AG, Wide L, Karlsson FA. Effects of short-term administration of growth hormone in healthy young men, women, and women taking oral contraceptives. *J Intern Med*. 2000;247:570-8.
133. Eden Engstrom B, Karlsson FA, Naessen T, Gillberg P, Wide L. Ambulatory morning growth hormone concentrations increase in men and decrease in women with age. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62:25-31.
134. Eder A, Watzek G. Treatment of a patient with sever osteoporosis and chronic polyarthritis with fixed implant-supported prosthesis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14:587-90.
135. Edwards M, Sarma U, Flanagan AM. Macrophage Colony-Stimulating Factor increases bone resorption by osteoclasts disaggregated from human fetal long bones. *Bone*. 1998;22:325-9.
136. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology*. 1989;125:825-33.
137. Ernst M, Rodan GA. Estradiol regulation of insulin-like growth factor-I expression in osteoblastic cells: evidence for transcriptional control. *Mol Endocrinol*. 1991;5:1081-9.
138. Ernst M, Rodan GA. Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH): positive correlation with the presence of the GH-induced IGF-binding protein BP-3. *Endocrinology*. 1990;127:807-14.
139. Eschen C, Andreassen TT. Growth hormone normalizes vertebral strength on ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1995;57:392-6.
140. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Glüer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA*. 1999;282:637-45. Erratum in: *JAMA* 1999 Dec 8;282(22):2124.
141. Faibish D, Gomes A, Boivin G, Binderman I, Boskey A. Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone*. 2005;36:6-12. Epub 2004 Nov 24.

142. Faulkner KG, Gluer CC, Majumdar S, Lang P, Engelke K, Genant HK. Noninvasive measurements of bone mass, structure, and strength: current methods and experimental techniques. *AJR Am J Roentgenol*. 1991;157:1229-37. Review.
143. Fernández-García D, Alonso G, Muñoz-Torres M. Tratamiento anabólico en la osteoporosis. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:341-5.
144. Feyen JHM, Elford P, Dipadova FE, Trechsel U. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*. 1989;4:633-8.
145. Fielder PJ, Mortensen DL, Mallet P, Carlsson B, Baxter RC, Clark RG. Differential long-term effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) growth hormone (GH), and IGF-I plus GH on body growth and IGF binding proteins in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. 1996 May;137(5):1913-20.
146. Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Torricelli P, Morrone G, Guzzardella GA, Giardino R, Krajewski A, Ravaglioli A, Belmonte MM, Benedittis AD, Biagini G. The effect of osteopenia on the osteointegration of different biomaterials: histomorphometric study in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2000;11:579-85.
147. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother*. 2004;58:487-93.
148. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Krajewski A, Ravaglioli A, Belmonte MM, Biagini G, Giardino R. Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2001;83:139-43.
149. Fini M, Nicoli Aldini N, Gandolfi MG, Mattioli Belmonte M, Giavaresi G, Zucchini C, De Benedittis A, Amati S, Ravaglioli A, Krajewski A, Rocca M, Guzzardella GA, Biagini G, Giardino R. Biomaterials for orthopedic surgery in osteoporotic bone: a comparative study in osteopenic rats. *Int J Artif Organs*. 1997;20:291-7.
150. Franchi M, Bacchelli B, Giavaresi G, De Pasquale V, Martini D, Fini M, Giardino R, Ruggeri A. Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. *J Periodontol*. 2007;78:879-88.
151. Franzen P, Ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz H, Heldin P, and Miyazono K. Cloning of a TGF- β type 1 receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell*. 1993;75:681-92.
152. Friberg B, Ekstrubbe A, Mellström D, Senneryby L. Brånemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001;3:50-6.
153. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976;47:327-59. Review. En Sodeck J, Cheifetz S. Molecular regulation of osteogenesis. En Davis JE, ed. *Bone engineering*. Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
154. Frost HM. A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod*. 2004;74:3-15. Review.
155. Frost HM. The regional acceleratory phenomenon. Intermediary organization of the skeleton. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, II:109-129, 1986.
156. Frost HM. The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1992;7:253-61. Review
157. Fujimoto T, Niimi A, Nakai H, Ueda M. Osseointegrated implants in a patient with osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:539-42.
158. Fujimoto T, Niimi A, Sawai T, Ueda M. Effects of steroid-induced osteoporosis on osseointegration of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:183-9.
159. Fukayama S, Tashjian AH Jr. Direct modulation by estradiol of the response of human bone cells (SaOS-2) to human parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology*. 1989;124:397-401.
160. Gallagher JC, Satpathy R, Rafferty K, Haynatzka V. The effect of soy protein isolate on bone metabolism. *Menopause*. 2004;11:290-8.
161. García-Barros M, Costoya JA, Ríos R, Arce V, Devesa J. N-glycosylated variants of growth hormone in human pituitary extracts. *Hor Res*. 2000;53:40-5.
162. Gehron Robey P, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res*. 1993;8 Suppl 2:S483-7.
163. Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med*. 1999;5:623-8.
164. Ghiron LJ, Thompson JL, Holloway L, Hintz RL, Butterfield GE, Hoffman AR, Marcus R. Effects of recombinant insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone turnover in elderly women. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1844-52.
165. Giavaresi G, Branda F, Causa F, Luciani G, Fini M, Nicoli Aldini N, Rimondini L, Ambrosio L, Giardino R. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) biomimetic coating to improve osseointegration of a PMMA/HA/glass composite implant: in vivo mechanical and histomorphometric assessments. *Int J Artif Organs*. 2004;27:674-80.
166. Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhart S, Burnand KG, Salomon F, Sonksen PH, Russell-Jones D. The effects of 10 years of recombinant human growth hormone in adult GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2596-602.
167. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin 11: A new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest*. 1994;93:1516-24.
168. Giustina A, Bussi AR, Jacobello C, Wehrenberg WB. Effects of recombinant human growth hormone (GH) on bone and intermediary metabolism in patients receiving chronic glucocorticoid treatment with suppressed endogenous GH response to GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:122-9.
169. Glassman SD, Carreon L, Djurasovic M, Campbell MJ, Puno RM, Johnson JR, Dimar JR. Posterolateral lumbar spine fusion with INFUSE bone graft. *Spine J*. 2007;7:44-9. Epub 2006 Nov 20.
170. Glassman SD, Dimar JR, Carreon LY, Campbell MJ, Puno RM, Johnson JR. Initial fusion rates with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix and a hydroxyapatite and tricalcium phosphate/collagen carrier in posterolateral spinal fusion. *Spine*. 2005;30:1694-8.
171. Goel HL, Moro L, King M, Teider N, Centrella M, McCarthy TL, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Marra E, Languino LR. Beta1 integrins modulate cell adhesion by regulating insulin-like growth factor-II levels in the microenvironment. *Cancer Res*. 2006;66:331-42.
172. Goff JP, Caperna TJ, Steele NC. Effects of growth hormone administration on vitamin D metabolism and vitamin D receptors in the pig. *Domest Anim Endocrinol*. 1990;7:425-33.
173. Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Stimulation of bone resorption in vitro by a non-prostanoid factor released by human monocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1983;762:471-4.
174. Gowen M, Wood DD, Mundy GR, Russell RGG. Studies on the actions of interleukin-1 on bone metabolism: IL-1 stimulation of bone cell proliferation, and inhibition of IL-1 induced bone resorption by interferon gamma. *Br J Rheumatol*. 1985;24:147-9.

175. Gowen M, Wood DD, Russell RG. Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity. *J Clin Invest.* 1985;75:1223-9.
176. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 years experience. *Laboratory animals.* 1981;15:163-70.(artículo)
177. Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation.* 1985;29:195-8. Review.
178. Grobbee DE, LIFT Steering Committee. LIFT study to continue as planned. *BMJ.* 2005;331:843. [Carta].
179. Guglielmi G. Quantitative computed tomography (QCT) and dual X-ray absorptiometry (DXA) in the diagnosis of osteoporosis. *Eur J Radiol.* 1995;20:185-7.
180. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Heymann D, Pilet P, Couillaud S, Faivre A, Daculsi G. Growth hormone-loaded macroporous calcium phosphate ceramic: in vitro biopharmaceutical characterization and preliminary in vivo study. *J Biomed Mater Res.* 1998;40:560-6.
181. Guise TA, Garrett IR, Bonewald LF, Mundy GR. The interleukin-1 receptor antagonist inhibits hypercalcemia mediated by interleukin-1. *J Bone Miner Res.* 1993;8:583-8.
182. Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4889-93.
183. Hagiwara S, Lane N, Engelke K, Sebastian A, Kimmel DB, Genant HK. Precision and accuracy for rat whole body and femur bone mineral determination with dual X-ray absorptiometry. *Bone Miner.* 1993;22:57-68.
184. Haguenaue D, Welch V, Shea B, Tugwell P, Adachi JD, Wells G. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2000;11:727-38.
185. Haguenaue M, Whitford GM, Clark MK, Jannausch ML. Elevated serum fluoride concentrations in women are not related to fractures and bone mineral density. *J Nutr.* 2005;135:2247-52.
186. Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg Am.* 1952;24-A-3:701-28.
187. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature.* 1990;343:336-40.
188. Hansen TB, Brixen K, Vahl N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Mosekilde L, Hagen C. Effects of 12 months of growth hormone (GH) treatment on calciotropic hormones, calcium homeostasis, and bone metabolism in adults with acquired GH deficiency: a double blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3352-9.
189. Hayashi K, Uenoyama K, Mashima T, Sugioka Y. Remodelling of bone around hydroxyapatite and titanium in experimental osteoporosis. *Biomaterials.* 1994;15:11-6.
190. Heald AH, Karvestedt L, Anderson SG, McLaughlin J, Knowles A, Wong L, Grill V, Cruickshank JK, White A, Gibson JM, Brismar K. Low insulin-like growth factor-II levels predict weight gain in normal weight subjects with type 2 diabetes. *Am J Med.* 2006;119:167.e9-15.
191. Hedner E, Linde A, Nilsson A. Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranes: an experimental study in rats. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1952-60.
192. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin like growth factor-I and II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology.* 1995;136:124-31.
193. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology.* 1988;122:254-60.
194. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem.* 1998;273:31327-36.
195. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DI, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;16:2-12.
196. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DI, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology.* 1999;140:4367-70.
197. Holder AT, Spencer EM, Preece MA. Effect of bovine growth hormone and a partially pure preparation of somatomedin on various growth parameters in hypopituitary dwarf mice. *J Endocrinol.* 1981;89:275-82.
198. Holloway L, Butterfield G, Hintz RL, Gesundheit N, Marcus R. Effect of recombinant human growth hormone on metabolic indices, body composition, and bone turnover in healthy elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:470-9.
199. Holmes SJ, Whitehouse RW, Swindell R, Economou G, Adams JE, Shalet SM. Effect of growth hormone replacement on bone mass in adults with adult onset growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol.* 1995;42:627-33.
200. Hopper JL, Seeman E. The bone density of female twins discordant for tobacco use. *N Engl J Med.* 1994;330:387-92.
201. Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H, Orimo H. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int.* 2000;11:721-4.
202. Horner A, Bishop NJ, Bord S, Beeton C, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE. Immunolocalisation of vascular endothelial - growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J Anat.* 1999;194:519-24.
203. Horton MA, Taylor ML, Arnett TR, Helfrich MH. Arg-gly-aspartic acid (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptor antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts. *Exp Cell Res.* 1991;195:368-75.
204. Hotchkiss CE. Use of peripheral quantitative computed tomography for densitometry of the femoral neck and spine in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone.* 1999;24:101-7.
205. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nature Med.* 1996;2:1132-6.
206. Hurley MM, Lee SK, Raisz LG, Bernecker P, Lorenzo J. Basic Fibroblast Growth Factor induces osteoclasts formation in murine bone marrow cultures. *Bone.* 1998;22:309-16.
207. Iezzi G, Degidi M, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A. Bone response to submerged, unloaded implants inserted in poor bone sites: a histological and histomorphometrical study of 8 titanium implants retrieved from man. *J Oral Implantol.* 2005;31:225-33.
208. Iglesias P, Díez JJ, Gómez-Pan A. Empleo terapéutico de la hormona de crecimiento en adultos. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, ed. *Retrasos del crecimiento* Madrid: 2ª Ed. Díaz de Santos SA; 1996. p. 377-95.
209. Ikeda S, Morishita Y, Tsutsumi H, Ito M, Shiraishi A, Arita S, Akahoshi S, Narusawa K, Nakamura T. Reductions in bone turnover, mineral, and structure associated with mechanical properties of lumbar vertebra and femur in glucocorticoid-treated growing minipigs. *Bone.* 2003;33:779-87.
210. Isaksson OGP, Janson JO, Gausse IAM. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science.* 1982;216:1237-9.
211. Isaksson OGP, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. Action of growth hormone: Current views. *Acta Paediatr Scand.* 1988;343:12-8.

212. Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson JO, Isaksson OGP. Effects of local administration of GH and IGF-I on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol*. 1986;250:E367-72.
213. Ishibe M, Nojima T, Ishibashi T, Koda T, Kaneda K, Rosier RN, Puzas JE. 17 beta-estradiol increases the receptor number and modulates the action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteosarcoma-derived osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*. 1995;57:430-5.
214. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;16. [Epub ahead of print]
215. Jandinski JJ. Osteoclasts activating factor is now interleukin-1 beta: historical perspective and biological implications. *J Oral Pathol*. 1988;17:145-52.
216. Jeffcoat MK, Chesnut CH. Systemic osteoporosis and oral bone loss: Evidence shows increased risk factors. *J Am Dent Assoc*. 1993;124:49-56.
217. Jeffcoat MK, Reddy MS, Wang IC, Meuninhoff LA, Farmer JB, Koth DL. The effect of systemic flurbiprofen on bone supporting dental implants. *J Am Dent Assoc*. 1995;126:305-11.
218. Jilka RL, Hancog G, Giarasole G, Passeri G, Williams DG, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclasts development after estrogen loss: Mediation by Interleukin-6. *Science*. 1992;257:88-91.
219. Jilka RL, Passeri G, Giarasole G, Cooper S, Abrams J, Broxmeyer H, Manolagas SC. Estrogen loss upregulates hematopoiesis in the mouse: a mediating role of IL-6. *Exp Hematol*. 1995;23:500-6.
220. Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, Williams DC, Roberson PK, Manolagas SC. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J Clin Invest*. 1998;101:1942-50.
221. Jilka RL. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: A 1998 update. *Bone*. 1998;23:75-81.
222. Jódar Gimeno E, Muñoz-Torres M, Escobar-Jiménez F, Quesada Charneco M, Luna del Castillo JD, Olea N. Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hyperthyroidism: Role of biological markers of bone turn-over. *Calcif Tissue Int*. 1997;61:370-6.
223. Johansson G, Grimby G, Sunnerhagen KS, Bengtsson B-A. Two years of growth hormone (GH) treatment increase isometric and isokinetic muscle strength in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2877-84.
224. Johansen JS, Pedersen SA, Jorgensen JO, Riis BJ, Christiansen C, Christiansen JS, Skakkebaek NE. Effects of growth hormone (GH) on plasma bone Gla protein in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:916-9.
225. Johansson AG, Burman P, Westermark K, Ljunghall S. The bone mineral density in acquired growth hormone deficiency correlates with circulating levels of IGF-I. *J Intern Med*. 1992;232:447-52.
226. Johansson AG, Lindh E, Blum WF, Kollerup G, Sorensen OH, Ljunghall S. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I in men with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996a;81:44-8.
227. Johansson G, Rosen T, Bosaeus I, Sjöström L, Bengtsson BA. Two years of growth hormone treatment increases bone mineral content and density in hypopituitary patients with adult-onset GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996b;81:2865-73.
228. Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD. Tumours producing human TNF induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology*. 1989;124:1424-7.
229. Johnston CC Jr, Bjarnason NH, Cohen FJ, Shah A, Lindsay R, Mitlak BH, et al. Long-term effects of raloxifene on bone mineral density, bone turnover, and serum lipid levels in early postmenopausal women: three-year data from 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Arch Intern Med*. 2000;160:3444-50.
230. Jorgensen JOL, Pedersen SA, Thuesen L, Jorgensen J, Ingemann-Hansen T, Skakkebaek EN, Christiansen JS. Beneficial effects of growth hormone treatment in GH-deficient adults. *Lancet*. 1989;1:1221-5.
231. Jorgensen PH, Bak B, Andreassen TT. Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. *Bone*. 1991;12:353-9.
232. Jux C, Leiber K, Hugel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O. Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology*. 1998;139:3296-305.
233. Kahn A, Gibbons R, Perkins S, Gazit D. Age-related bone loss. A hypothesis and initial assessment in mice. *Clin Orthop*. 1995;313:69-75.
234. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*. 1989;124:7-16.
235. Kanis JA. Osteoporosis Blackwell Science Ltd. Oxford, 1996.
236. Karsdal MA, Andersen TA, Bonewald L, Christiansen C. Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA Cell Biol*. 2004;23:155-65.
237. Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaisse JM, Foged NT. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;277:44061-7.
238. Karsenty G. Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*. 2001;142: 2731-3.
239. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksson EF. GH stimulates the proliferation and differentiation of normal osteoblast like cells in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1993;52:222-6.
240. Kassem M, Mosekilde L, Eriksson EF. Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. *Growth Regulation*. 1994;4:131-5.
241. Kassem M. Cellular and molecular effects of growth hormone and estrogen on human bone cells. *APMIS Suppl*. 1997; 71:1-30.
242. Kaufman JM, Taelman P, Vermeulen A, Vandeweghe M. Bone mineral status in growth hormone-deficient males with isolated and multiple pituitary deficiencies of childhood onset. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74:118-23.
243. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop*. 1995;313:36-46.
244. Kember NF, Walker KV. Control of bone growth in rats. *Nature*. 1971;229:428-9.
245. Kidder LS, Schmidt IU, Evans GL, Turner RT. Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats. *Calc Tissue Int*. 1997;61:327-35.
246. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem*. 1996;271:28890-7.

247. Klein GL, Wolf SE, Langman CB, Rosen CJ, Mohan S, Keenan BS, Matin S, Steffen C, Nicolai M, Sailer DE, Herndon DN. Effects of therapy with recombinant human growth hormone on insulin-like growth factor system components and serum levels of biochemical markers of bone formation in children after severe burn injury. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:21-4.
248. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris).* 2005;53:576-80. Epub 2005 Jan 28. Review.
249. Koea JB, Breier BH, Douglas RG, Gluckman PD, Shaw JHF. Anabolic and cardiovascular effects of recombinant human growth hormone in surgical patients with sepsis. *Br J Surg.* 1996;83:196-202.
250. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, Flyvbjerg A, Haas N, Raschke M. Homologous growth hormone accelerates bone healing--a biomechanical and histological study. *Bone.* 2003;33:628-37.
251. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson H, Gao RT, Inada M, Sato M, Okamoto , Kitamiura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89:755-64.
252. Kong YY, Penninger JM. Molecular control of bone remodelling and osteoporosis. *Exp Gerontol.* 2000;35:947-56.
253. Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi L, Tan I, Timms E, Caparelli C, Morony S, Oliveira-Dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999;397:315-23.
254. Kopple JD, Brunori G, Leiserowitz M, Fouque D. Growth hormone induces anabolism in malnourished maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:952-8. Epub 2005 Mar 8.
255. Koshiyama H, Nakamura Y, Tanaka S, Minamikawa J. Decrease in carotid intima-media thickness after 1-year therapy with etidronate for osteopenia associated with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2793-6.
256. Kotzmann H, Bernecker P, Hubsch P, Pietschmann P, Woloszczuk W, Svoboda T, Geyer G, Luger A. Bone mineral density and parameters of bone metabolism in patients with acromegaly. *J Bone Miner Res.* 1993;8:459-65.
257. Kremer M, Judd J, Rifkin B, Ausmann J, Oursler MJ. Estrogen modulation of osteoclast lysosomal enzyme secretion. *J Cell Biochem.* 1995;57:271-9.
258. Kurihara N, Chenu C, Miller M, Civin C, Roodman GD. Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology.* 1990;126:2733-41.
259. La Croix AZ, Ott SM, Ichikawa L, Scholes D, Barlow WE. Low dose hydrochlorothiazide and preservation of bone mineral density in older adults. *Ann Intern Med.* 2000;133:519-26.
260. Lakkakorpi PT, Vaananen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 1995;32:171-81.
261. Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding proteins: structural and molecular relationships. *Growth Factors.* 1991;5:19-28.
262. Lanes R, Gunczler P, Paoli M, Weisinger JR. Bone mineral density of prepubertal age girls with Turner's syndrome while on growth hormone therapy. *Horm Res.* 1995;44:168-71.
263. Landin-Wilhelmsen K, Nilsson A, Bosaeus I, Bengtsson BA. Growth hormone increases bone mineral content in postmenopausal osteoporosis: a randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res.* 2003;18:393-405.
264. Lang P, Steiger P, Faulkner K, Gluer C, Genant HK. Osteoporosis. Current techniques and recent developments in quantitative bone densitometry. *Radiol Clin North Am.* 1991;29:49-76. Review.
265. Langdahl BL, Kassem M, Moller MK, Eriksen EF. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:176-83.
266. Langer, 1993
267. Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993;53 Suppl 1:S102-7.
268. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993;53 Suppl 1:S102-6; discussion S106-7. Review
269. Lau KH, Kapur S, Kesavan C, Baylink DJ. Upregulation of the WNT, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *J Biol Chem.* 2006 Feb 3. Epub ahead of print.
270. Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, Chow JW. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995;268:E318-27.
271. Leung K, Rajkovic IA, Peters E, Markus I, Van Wyk JJ, Ho KK. Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action. *Endocrinology.* 1996;137:2694-702.
272. Lewinson D, Shenzer P, Hochberg Z. Growth hormone involvement in the regulation of tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells that are active in cartilage and bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 1993;52:216-21.
273. Li L, Pettit AR, Gregory LS, Forwood MR. Regulation of bone biology by prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS): A rose by any other name... *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Feb 3. Epub ahead of print.
274. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1997;20:55-61.
275. Lian JB, Stein GS. The developmental stages of osteoblasts growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF- β_1) and hormones (vitamin D and glucocorticoids). *J Oral Implantol XIX.* 1993;2:95-105.
276. Lieberman SA, Holloway L, Marcus R, Hoffman AR. Interactions of growth hormone and parathyroid hormone in renal phosphate, calcium, and calcitriol metabolism and bone remodeling in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 1994; 9:1723-8.
277. Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS.* 1995;103:140-6.
278. Lombardi G, Tauchmanova L, Di Somma C, Musella T, Rota F, Savanelli MC, Colao A. Somatopause: dimetabolic and bone effects. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(10 Suppl):36-42.
279. Lugo GG, de Falco Caparbo V, Guzzo ML, Konig B Jr, Jorgetti V. Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent.* 2000;9:303-9.
280. Ma T, Nelson ER, Mawatari T, Oh KJ, Larsen DM, Smith RL, Goodman SB. Effects of local infusion of OP-1 on particle-induced and NSAID-induced inhibition of bone ingrowth in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79:740-6.
281. Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA. Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76:713-21.
282. Mann DR, Rudman CG, Akinbami MA, Gould KG. Preservation of bone mass in hypogonadal female monkeys with recombinant human growth hormone administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74:1263-9.
283. Maor G, Hochberg Z, van der Mark K, Heinigard D, Silbermann M. Human growth hormone enhances chondrogenesis and osteogenesis in a tissue culture system of chondroprogenitor cells. *Endocrinology.* 1989;125:1239-45.

284. Marcelli C, Yates AJP, and Mundy GR. In vivo effects of human recombinant transforming growth factor beta on bone turnover in normal mice. *J Bone Miner Res.* 1990;5:1087-96.
285. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron.* 2005;36:630-44.
286. Marcus R, Butterfield G, Holloway L, Gilliland L, Baylink DJ, Hintz RL, Sherman BM. Effects of short term administration of recombinant growth hormone to elderly people. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70:9-527.
287. Markussis V, Beshyah SA, Fisher C, Sharp P, Nicolaides AN, Johnston DG. Detection of premature atherosclerosis by high-resolution ultrasonography in symptom-free hypopituitary adults. *Lancet.* 1992;340:1188-92.
288. Martha Jr PM: Human growth hormone binding-proteins: Function and interest in human growth abnormalities. *Anal Esp Ped.* 1994;58:24-7.
289. Martha PM Jr, Reiter EO, Davila N, Shaw MA, Holcombe JH, Baumann G. Serum growth hormone (GH)-binding-protein/receptor: an important determinant of GH responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:1464-9.
290. Martha PM Jr, Rogol AD, Carlsson LM, Gesundheit N, Blizzard RM. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys I. Serum growth hormone-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:452-7.
291. Martínez DA, Orth MW, Carr KE, Vanderby R Jr, Vilas AC: Cortical bone growth and maturational changes in dwarf rats induced by recombinant human growth hormone. *Am J Physiol.* 1996;270:51-9.
292. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Biphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1567-75.
293. McCarthy TL, Casinghino S, Centrella M, Canalis E. Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandin E2, growth hormone, and the insulin-like growth factors. *J Cell Physiol.* 1994;160:163-75.
294. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Regulatory effects of insulin-like growth factor I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology.* 1989;124:301-9.
295. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop.* 2007;31:729-34. Epub 2007 Jul 17.
296. Mich CE. Prótesis dental sobre implantes. Elsevier España, S.A. 2006. Ed. En Español. Madrid. P:1-17
297. Miller PD, Zapalowski C, Kulak CAM, Bilezikian JP. Bone densitometry: The best way to detect osteoporosis and to monitor therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1867-71.
298. Milovancev M, Muir P, Manley PA, Seeherman HJ, Schaefer S. Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in 4 dogs. *Vet Surg.* 2007;36:132-40.
299. Minegishi T, Kawamoto K, Yamada Y, Oshikawa M, Kishida M, Sato S, Ito K. Effects of ipriflavone on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvaria. *J Oral Sci.* 2002;44:7-11.
300. Minsk L, Polson AM. Dental implant outcomes in postmenopausal women undergoing hormone replacement. *Compend Contin Educ Dent.* 1998;19:859-62.
301. Miyaniishi K, Trindade MC, Ma T, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Periprosthetic osteolysis: induction of vascular endothelial growth factor from human monocyte/macrophages by orthopaedic biomaterial particles. *J Bone Miner Res.* 2003;18:1573-83.
302. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K, Kumegawa M. IGF-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology.* 1992;131:1075-80.
303. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop.* 1991;263:30-48.
304. Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser V, Dony C, Lang K, Bayunk DJ. Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem.* 1995;35:20424-31.
305. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G. Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 1993;273:279-86.
306. Morey ER, Baylink JJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science.* 1978;201:1138-41.
307. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:351-61.
308. Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN. Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone.* 1998;23:343-52.
309. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* 1997;89:774-9.
310. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S505-10.
311. Mundy GR. Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Regulation.* 1993;3:124-8.
312. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res.* 1991;26:213-7.
313. Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop.* 1995;313:19-26.
314. Nagaya N, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary-associated cachexia. *Intern Med.* 2006;45:127-34. Epub 2006 Mar 1.
315. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Lin H, Maastricht S, Swain M, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone.* 2001;28:80-6.
316. Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:218-23.
317. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effects of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994;15:203-8.
318. Neugebauer J, Traini T, Thams U, Piattelli A, Zoller JE. Peri-Implant Bone Organization Under Immediate Loading State. Circularly Polarized Light Analyses: A Minipig Study. *J Periodontol.* 2006;77:152-60.
319. Newman E, Turner AS, Walk JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone.* 1995;16:277S-84S.
320. Nielsen HM, Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand.* 1991;62:244-7.
321. Nijweide PJ, Burger EH, Nulend JK, Van Der Plas A. The osteocyte. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology.* San Diego, CA: Academic; 1996. p. 115-26.
322. Nilsson A, Swolin D, Enerback S, Ohlsson C. Expression of functional growth hormone receptors in cultured human osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3483-8.
323. Nilsson AG. Effects of growth hormone replacement therapy on bone markers and bone mineral density in growth hormone-deficient adults. *Horm Res.* 2000;54 Suppl 1:52-7. Review.

324. Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatani M, Kobayashi T, Chihara K. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclasts differentiation. *Endocrinology*. 1996;137:35-41.
325. Noda M and Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor beta. *Endocrinology*. 1989;124:2991-4.
326. Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Biscardi A, Buffenstein R. Validation and application of dual-energy X-ray absorptiometry to measure bone mineral density in rabbit vertebrae. *J Clin Densitom*. 2000;3:49-55.
327. Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Buffenstein R. Calcium metabolism and bone mass in female rabbits during skeletal maturation: Effects of dietary calcium intake. *Bone*. 2001;29:62-9.
328. Nutrient Requirements of Rabbits. Second revised edition. National Academy of Sciences. Washington DC. 1977.(artículo)
329. Oda H, Nakamura K, Matsushita T, Yamamoto S, Ishibashi H, Yamazaki T, Morimoto S. Clinical use of a newly developed calcium phosphate cement (XSB-671D). *J Orthop Sci*. 2006;11:167-74.
330. O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW, Holmes SJ, Adams JE, Shalet SM. Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:1344-8.
331. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*. 1993;64:432-44.
332. Ohira Y, Kawano F, Wang XD, Sudoh M, Iwashita Y, Majima HJ, Nonaka I. Irreversible morphological changes in leg bone following chronic gravitational unloading of growing rats. *Life Sci*. 2006; Mar 6. Epub ahead of print.
333. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev*. 1998;19:55-79. Review.
334. Ohlsson C, Isaksson O, Lindahl A. Clonal analysis of rat tibia growth plate chondrocytes in suspension culture--differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I. *Growth Regul*. 1994;4:1-7.
335. Ohlsson C, Sjogren K, Jansson JO, Isaksson OG. The relative importance of endocrine versus autocrine/paracrine insulin-like growth factor-I in the regulation of body growth. *Pediatr Nephrol*. 2000;14:541-3.
336. Okamura A, Ayukawa Y, Iyama S, Koyano K. Effect of the difference of bone turnover on peri-titanium implant osteogenesis in ovariectomized rats. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70:497-505.
337. Okazaki R, Conover CA, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL. Normal human osteoblast-like cells consistently express genes for insulin-like growth factors I and II but transformed human osteoblast cell lines do not. *J Bone Miner Res*. 1995;10:788-95.
338. Ono T, Kanzaki S, Seino Y, Baylink DJ, Mohan S. Growth hormone (GH) treatment of GH-deficient children increases serum levels of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding protein-3 and -5, and bone alkaline phosphatase isoenzyme. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:2111-6.
339. Orozco P. Actualización en el abordaje y tratamiento de la osteoporosis 2001. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud 2001;25:117-41.
340. Ortoft G, Oxlund H. Qualitative alterations of cortical bone in female rats after long-term administration of growth hormone and glucocorticoid. *Bone*. 1996;18:581-90.
341. Ortolani S. Bone densitometry: assessing the effects of growth hormone treatment in adults. *Horm Res*. 2000;54 Suppl 1:19-23. Review.
342. Osorio F, Varas J y Rodríguez EC. Osteoporosis: Aspectos básicos. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. *Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento*. Madrid: Médica Panamericana; 2003. p. 1-10.
343. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997;89:765-71.
344. Oursler MJ, Pederson L, Pyfferoen J, Osdoby P, Fitzpatrick L, Spelsberg TC. Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. *Endocrinology*. 1993;132:1373-80.
345. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60. Review.
346. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. En: Peck WA, ed. *Bone and Mineral Research*, vol 3. Amsterdam: The Netherlands Elsevier Science Publisher; 1985:1. En: Sodeck J, Cheifetz S. Molecular regulation of osteogenesis. En Davis JE, ed. *Bone engineering*. Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
347. Ozawa S, Ogawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa R, Nishimura D, Nishimura I. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone*. 2002;30:137-43.
348. Panel de expertos. Documento 2003 de la Sociedad Española de Reumatología sobre la osteoporosis posmenopáusica. *Rev Esp Reumatol*. 2003;30:565-71. Descargado de :<http://www.doyma.es>.
349. Pape GS, Friedman M, Underwood LE, Clemmons DR. The effect of growth hormone on weight gain and pulmonary function in patients with chronic obstructive lung disease. *Chest*. 1991;99:1495-500.
350. Parfitt AM. Osteoclast precursors as leukocytes: importance of the area code. *Bone*. 1998;23: 491-4.
351. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*. 1994;55:273-86.
352. Pead MJ, Suswillo RS, Skerry TM, Veda S, Lanyon LE. Increased ³H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic loading in vivo. *Calcif Tissue Int*. 1988;43:92-6.
353. Pereira-Júnior OC, Rahal SC, Iamaguti P, Felisbino SL, Pavan PT, Vulcano LC. Comparison between polyurethanes containing castor oil (soft segment) and cancellous bone autograft in the treatment of segmental bone defect induced in rabbits. *J Biomater Appl*. 2007;21:283-97. Epub 2006 Mar 16.
354. Pérez Casas A, Bengoechea ME. Anatomía funcional del aparato locomotor. Madrid: Paz Montalvo SA; 1978.
355. Pfeilschifter J and Mundy GR. Modulation of transforming growth factor beta activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:2024-8.
356. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1989;4:113-8.
357. Piekarski K and Munro M. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature*. 1977;269:80-2.
358. Petrokovski J. The bony residual ridge in man. *J Prosthet Dent*. 1975;34:456-62.
359. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Ebery S. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest*. 1987;80:706-10.
360. Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop*. 1985;200:87-9.
361. Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 1992. p.1032-45.

362. Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S457-65.
363. Raschke M, Rasmussen MH, Govender S, Segal D, Suntum M, Christiansen JS. Effects of growth hormone in patients with tibial fracture: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:341-51.
364. Reche C, Rodríguez EC, Echevarría R. Repercusiones socioeconómicas y sanitarias de las fracturas osteoporóticas, presentación clínica y diagnóstico. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. *Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento.* Madrid: Médica Panamericana; 2003. p: 21-9.
365. Rechler MM. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm.* 1993;47: 1-114.
366. Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by Bone Morphogenetic Proteins. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S499-502.
367. Reid IR, Ames RW, Orr-Walker BJ, et al. Hydro-chlorothiazide reduces loss of cortical bone in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Am J Med.* 2000;109:362-70.
368. Reyes Balaguer J, Moreno Olmos J. Prevalencia de osteopenia y osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. *Aten Primaria.* 2005;35:342-7.
369. Rickard DJ, Hofbauer LC, Bonde SK, Gori F, Spelsberg TC, Riggs BL. Bone morphogenetics protein-6 production in human osteoblastic cell lines: selective regulation by estrogen. *J Clin Invest.* 1998;101:413-22.
370. Rizzoli R, Bonjour JP. Dietary protein and bone health. *J Bone Miner Res.* 2004;19: 527-31. Epub 2004 Feb 9.
371. Roberts E. Bone Tissue Interface. *J Dental Educat.* 1988;52:804-9.
372. Robinson D, Bab I, Nevo Z. Osteogenic Growth Peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 1995;10:690-6.
373. Robinson JA, Susulic V, Liu YB, Taylor C, Hardenburg J, Girona V, Zhao W, Kharode Y, McLarney S, Bai Y, Malone DP, Murrills R, Bex F. Identification of a PTH regulated gene selectively induced in vivo during PTH-mediated bone formation. *J Cell Biochem.* 2006 Mar 2; [Epub ahead of print]
374. Rocca M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R. Osteointegration of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium screws in long-term ovariectomized sheep. *Biomaterials.* 2002;23:1017-23.
375. Rocca M, Fini M, Giavaresi G, Nicolini Aldini N, Giardino R. Tibial implants: biomechanical and histomorphometric studies of hydroxyapatite-coated and uncoated stainless steel and titanium screws in long-term ovariectomized sheep. *Int J Artif Organs.* 2001;24:649-54.
376. Rodríguez JC, Maestro A, Fournier J, et al. Estudio epidemiológico de las fracturas de extremidad proximal de fémur. *Rev Ortop Traumatol.* 1994;38:349-52.
377. Romanillos JO, Rodríguez EC. Últimas investigaciones ortopédicas sobre osteoporosis y sus posibles aplicaciones prácticas. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. *Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento.* Madrid: Médica Panamericana; 2003. p. 167-97.
378. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin 6: a potential autocrine/ paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest.* 1992;89:46-52.
379. Rosen CJ, Wüster C. Growth hormone rising: Did we quit too quickly?. *J Bone Miner Res.* 2003 Mar;18(3):406-9.
380. Rosen CJ. Serum-insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins: clinical implications. *Clin Chem.* 1999;45:1384-90.
381. Rosen HN, Chen V, Cittadini A, Greenspan SL, Douglas PS, Moses AC, Beamer WG. Treatment with growth hormone and IGF-I in growing rats increases bone mineral content but not bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 1995 ;10:1352-8.
382. Rosen T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet.* 1990;336:285-8.
383. Rosen T, Eden S, Larson G, Wilhelmsen L, Bengtsson BA. Cardiovascular risk factors in adult patients with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1993;129:195-200.(a)
384. Rosen T, Hansson T, Granhed H, Szucis J, Bengtsson BA. Reduced bone mineral content in adult patients with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1993;129:201-6.(b)
385. Rosen T, Wilhelmsen L, Landin-Wilhelmsen K, Lappas G, Bengtsson BA. Increased fracture frequency in adult patients with hypopituitarism and GH deficiency. *Eur J Endocrinol.* 1997;137:240-5.
386. Rudling M, Norstedt G, Olivecrona H, Reihner E, Gustafsson JA, Angelin B. Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:6983-7.
387. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Roudman IW, Mattson DE. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med.* 1990;323:1-6.
388. Russell RGG. The assessment of bone metabolism in vivo using biochemical approaches. *Horm Metab Res.* 1997;29:138-44.
389. Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinology.* 1985;116:2563-8.
390. Saban J, Schneider GB, Bolt D, King D. Erythroid-specific expression of human growth hormone affects bone morphology in transgenic mice. *Bone.* 1996;18:47-52.
391. Sabatini M, Boyce B, Aufdemorte T, Bonewald L, Mundy GR. Infusions of recombinant human interleukin-1 alpha and beta cause hypercalcemia in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:5235-9.
392. Saggese G, Baroncelli G, Federico G, Bertelloni S. Effects of Growth Hormone on phosphocalcium homeostasis and bone metabolism. *Horm Res.* 1995;44 (suppl 3):55-63.
393. Saggese G, Baroncelli G, Federico G, Bertelloni S. Effects of Growth Hormone on phosphocalcium homeostasis and bone metabolism. *Horm Res.* 1995;44 Suppl 3:55-63.
394. Saintier D, Khanine V, Uzan B, Ea HK, de Vernejoul MC, Cohen-Solal ME. Estradiol inhibits adhesion and promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro.
395. Salles JP, Netelenbos JC, Slootweg MC. Growth hormone induces tyrosine phosphorylation of annexin I in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1996;137:4358-62.
396. Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sonksen PH. The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N Engl J Med.* 1989;321:1797-803.
397. Sanchez CP, Goodman WG, Brandli D, Goldenhersh M, Murray C, Carlton E, Hahn T, Salusky IB. Skeletal response to recombinant human growth hormone (rhGH) in children treated with long-term corticosteroids. *J Bone Miner Res.* 1995;10:2-6.
398. Sandstedt J, Ohlsson C, Norjavaara E, Nilsson J, Tornell J. Disproportional bone growth and reduced weight gain in gonadectomized male bovine growth hormone transgenic and normal mice. *Endocrinology.* 1994;135:2574-80.
399. Santoro NF, Col NF, Eckman MH, Wong JB, Paulker SG, Cauley JA, Zmuda J, et al. Therapeutic controversy: Hormone replacement therapy--where are we going?. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1798-812.

400. Sarnat H, Kaplan I, Pertzelan A, Laron Z. Comparison of dental findings in patients with isolated growth hormone deficiency treated with human growth hormone and intreated patients with Laron-type dwarfism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;66:581-6.
401. Sass DA, Jerome CP, Bowman AR, Bennett-Cain A, Ginn TA, LeRoith D, Epstein S. Short-term effects of growth hormone and IGF-I on cancellous bone formation in Rhesus Macaque monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1202-9.
402. Schmid C. Growth hormone replacement therapy. Clues and claims. *Acta Endocrinol.* 1993;129:185-7.
403. Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants.* 2006;16:61-9. Review.
404. Schmidt C, Priemel M, Kohler T, Weusten A, Muller R, Amling M, Eckstein F. Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (microCT). *J Bone Miner Res.* 2003;18:1486-96.
405. Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res.* 1997;48 Suppl 5:50-9.
406. Schreiweis MA, Orban JI, Ledur MC, Hester PY. The use of densitometry to detect differences in bone mineral density and content of live White Leghorns fed varying levels of dietary calcium. *Poult Sci.* 2003;82:1292-301.
407. Schweizer R, Martin DD, Schwarze CP, Binder G, Georgiadou A, Ihle J, Ranke MB. Cortical bone density is normal in prepubertal children with growth hormone (GH) deficiency, but initially decreases during GH replacement due to early bone remodeling. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5266-72.
408. Seckinger P, Klein-Nulend J, Alander C, Thompson RC, Dayer JM, Raisz LG. Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production. *J Immunol.* 1990;145:4181-4.
409. Serrano Cuenca V, Casas Hernández A. Factores de crecimiento: ¿Un nuevo enfoque terapéutico?. *Periodoncia.* 1997;7:99-115.
410. Sherlock M, Toogood AA. Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis. *Pituitary.* 2007;10:189-203.
411. Siejka A, Stepień T, Lawnicka H, Krupinski R, Komorowski J, Stepień H. Effect of the growth hormone-releasing hormone [GHRH(1-44)NH₂] on IL-6 and IL-8 secretion from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Endocr Regul.* 2005;39:7-11.
412. Sievänen H, Kannus P, Järvinen M. Precision of measurement by dual-energy X-ray absorptiometry of bone mineral density and content in rat hindlimb in vitro. *J Bone Miner Res.* 1994;9:473-8.
413. Singh K, Smucker JD, Gill S, Boden SD. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct in posterolateral lumbar spine fusion: a prospective CT-scan analysis at one and two years. *J Spinal Disord Tech.* 2006;19:416-23. Erratum in: *J Spinal Disord Tech.* 2007;20:185. Gill, Sanjitpal [added].
414. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennet L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliot R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89: 309-19.
415. Slootweg MC, Hoogerbrugge CM, de Poorter TL, Duursma SA, van Buul-Offers SC. The presence of classical insulin-like growth factor (IGF) type-I and -II receptors on mouse osteoblasts: autocrine/paracrine growth effect of IGFs?. *J Endocrinol.* 1990;125:271-7.
416. Slootweg MC, Ohlsson C, Salles JP, de Vries CP, Netelenbos JC. Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1995;136:4210-7.
417. Slootweg MC, Ohlsson C, van Elk EJ, Netelenbos JC, Andress DL. Growth hormone receptor activity is stimulated by insulin-like growth factor binding protein 5 in rat osteosarcoma cells. *Growth Regul.* 1996;6:238-46.
418. Slootweg MC, Swolin D, Netelenbos JC, Isaksson OG, Ohlsson C. Estrogen enhances growth hormone receptor expression and growth hormone action in rat osteosarcoma cells and human osteoblast-like cells. *J Endocrinol.* 1997;155:159-64.
419. Slootweg MC, Van Buul-Offers SC, Hermann-Erlee MPM, Van der Meer JM, Duursma SA. Growth hormone is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. *J Endocrinol.* 1988;116:R11-3.
420. Slootweg MC. Growth hormone and bone. *Horm Metab Res.* 1993;25:335-43.
421. Slotte C, Lundgren D, Sennerby L, Lundgren AK. Influence of preimplant surgical intervention and implant placement on bone wound healing. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:528-34.
422. Smith D, Gowen M, Mundy GR. Effects of interferon gamma and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology.* 1987;120:2494-9.
423. Sociedad Española de Geriátría y Gerodontología. Decálogo de la SEGG para prevenir y tratar la osteoporosis en las personas mayores. *Jano On-line.* 20/10/2005.
424. Sodeck J, Cheifetz S. Molecular regulation of osteogenesis. En: Davis JE, ed. *Bone engineering.* Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
425. Spagnoli A, Rosenfeld RG. The mechanisms by which growth hormone brings about growth. The relative contributions of growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996;25:615-31.
426. Steinberg TH, Civitelli, Geist ST, Robertson AJ, Hick E, Veenstra RD, Wang H-Z, Warlow PM, Westphale EM, Laing JG, Beyer EC. Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* 1994;13:744-50.
427. Stenport VF, Olsson B, Morberg P, Tornell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2001;3:135-41.
428. Stracke H, Schultz A, Maeller D, Rossol S, Schatz H. Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF-I in bone organ culture. *Acta Endocrinol.* 1984;107:16-24.
429. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res.* 1997;12:869-79.
430. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone.* 2004;35(4):828-35.
431. Swegle JM, Kelly MW. Tibolone: a unique version of hormone replacement therapy. *Ann Pharmacother.* 2004;38:874-81.
432. Sykaras N y Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician?. *J Oral Sci.* 2003;45:57-73.
433. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90: 11924-8.
434. Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, Burr DB, Turner CH, Yokota H. Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. *Calcif Tissue Int.* 2005;76:261-71.
435. Tatakis D. Interleukin-1 and Bone Metabolism: A Review. *J Periodontol.* 1993;64:416-31.

436. Taub DD, Tsarfay G, Lloyd AR, Scott KD, Longo DL, Murphy WJ. Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogenic engraftment. *J Clin Invest.* 1994;94:293-300.
437. Teng Chung T, Hinds CJ. Treatment with GH and IGF-1 in critical illness. *Crit Care Clin.* 2006;22:29-40, vi. Review.
438. Thacker JD, Dedhar S, Hogge DE. The effect of GM-CSF and G-CSF on the growth of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 1994;56: 236-43.
439. Theyse LF, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van Doorn J, Terlouw M, Mol JA, Voorhout G, Hazewinkel HA. Expression of osteotropic growth factors and growth hormone receptor in a canine distraction osteogenesis model. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:266-73.
440. Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med.* 1986;164:104-12.
441. Thoren M, Soop M, Degerblad M, Saaf M. Preliminary study of the effects of growth hormone substitution therapy on bone mineral density and serum osteocalcin levels in adults with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1993;128:41-3.
442. Toogood AA. The somatopause: an indication for growth hormone therapy? *Treat Endocrinol.* 2004;3:201-9. Review.
443. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JA. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:193-202.
444. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:807-11.
445. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Impl Res.* 2002;13:623-30.
446. Tresguerres IF. Influencia de la hormona de crecimiento en la osteointegración. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, 1999.
447. Tresguerres JAF, Somatomedinas. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. Retrasos del crecimiento, fisiopatología. Madrid: Díaz de Santos SA; 1992. p. 55-68.
448. Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Experimental Gerontology.* 2003;38:605-14.
449. Tseng KF, Bonadio JF, Stewart TA, Baker AR, Goldstein SA. Local expression of human growth hormone in bone results in impaired mechanical integrity in the skeletal tissue of transgenic mice. *J Orthop Res.* 1996;14:598-604.
450. Tsutsumi H, Katagiri K, Takeda S, Nasu T, Igarashi S, Tanigawa M, Mamba K. Standardized data and relationship between bone growth and bone metabolism in female Gottingen minipigs. *Exp Anim.* 2004;53:331-7.
451. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater.* 2001;1:66-81.
452. Turner RT. Effects of short-term spaceflight and recombinant human growth hormone (rhGH) on bone growth in young rats. *Aviat Space Environ Med.* 1995;66:763-9. Abstract.
453. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone.* 1999;25:517-23.
454. Ulrich-Vinther M. Gene therapy methods in bone and joint disorders. Evaluation of the adeno-associated virus vector in experimental models of articular cartilage disorders, periprosthetic osteolysis and bone healing. *Acta Orthop Suppl.* 2007;78:1-64. Review.
455. Valk NK, Erdtsieck RJ, Algra D, Lamberts SW, Pols HA. Combined treatment of growth hormone and the bisphosphonate pamidronate, vs. treatment with GH alone, in GH-deficient adults: the effects on renal phosphate handling, bone turnover and bone mineral mass. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 1995;43:317-4.
456. Van de Weghe M, Taelman P, Kaufman JM. Short and long-term effects of growth hormone treatment on bone turnover and bone mineral content in adult growth hormone deficient males. *Clin Endocrinol.* 1993;39:409-15.
457. Veitch SW, Findlay SC, Ingle BM, Ibbotson CJ, Barrington A, Hamer AJ, Eastell R. Accuracy and precision of peripheral quantitative computed tomography measurements at the tibial metaphysis. *J Clin Densitom.* 2004;7:209-17.
458. Verhaeghe J, van Bree R, Van Herck E, Thomas H, Skottner A, Dequeker J, Mosekilde L, Einhorn TA, Bouillon R. Effects of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor-I, with or without 17 beta-estradiol, on bone and mineral homeostasis of aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1723-35.
459. Wang X-F, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell.* 1991;67:797-805.
460. Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ. Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H2O2. *J Immunol.* 1995;154:1909-18.
461. Weinand C, Gupta R, Huang AY, Weinberg E, Madisch I, Qudsi RA, Neville CM, Pomerantseva I, Vacanti JP. Comparison of hydrogels in the in vivo formation of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and beta-tricalcium phosphate. *Tissue Eng.* 2007;13:757-65.
462. Weber HP, Fiorellini JP, Paquette DW, Howell TH, Williams RC. Inhibition of peri-implant bone loss with the nonsteroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen in beagle dogs. A preliminary study. *Clin Oral Impl Res.* 1994;5:148-53.
463. Weisbroth SH, Fudens JH. Use of ketamine hydrochloride as an anesthetic in laboratory rabbits, rats, mice and guinea pigs. *Laboratory Animal Science.* 1972;22:904-6.(artículo)
464. Weiss S, Henle P, Bidlingmaier M, Moghaddam A, Kasten P, Zimmermann G. Systemic response of the GH/IGF-I axis in timely versus delayed fracture healing. *Growth Horm IGF Res.* (2007), doi:10.1016/j.ghir.2007.09.002
465. Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology.* 2ª ed. New York: Churchill Livingstone 1987.
466. White SC, Taguchi A, Kao D, Wu S, Service SK, Yoon D, et al. Clinical and panoramic predictors of femur bone mineral density. *Osteoporos Int.* 2005;16:339-46.
467. Whitehead HM, Boreham C, McIlrath EM, Sheridan B, Kennedy L, Atkinson AB, Hadden DR. Growth hormone treatment of adults with growth hormone deficiency: results of a 13-month placebo controlled cross-over study. *Clin Endocrinol.* 1992;36:45-52.
468. WHO. Assessment of osteoporotic fracture risk and its role in screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series num 843, Génova 1994.
469. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Reddy MS, Johnsons HG, Hall CM, Goldhaber P. Ibuprofen: an inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *J Periodont Res.* 1988;23:225-9.
470. Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, Goldhaber P, Johnson HG, Wechter WJ. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science.* 1985;227:640-2.

471. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu CP, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA: Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo Journal*. 2003;22:6267-76.
472. Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C, Latham JA. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*. 2005;280:2498-502. Epub 2004 Nov 12.
473. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick HM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242:1528-34.
474. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventrone F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994;370:341-7.
475. Wright NM, Papadea N, Veldhuis JD, Bell NH. Growth hormone secretion and bone mineral density in prepubertal black and white boys. *Calcif Tissue Int*. 2002;70:146-52. Epub 2002 Feb 15.
476. Wright NM, Renault J, Willi S, Veldhuis JD, Pandey JP, Gordon L. Greater secretion of growth hormone in black than in white men: possible factor in greater bone mineral density. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:2291-7.(a)
477. Wright NM, Renault J, Hollis B, Bell NH, Key LL. Effect of growth hormone on bone: bone mineral density, trabecular bone volume, and alkaline phosphatase improve or are restored in the dwarf rat treated with growth hormone. *J Bone Miner Res*. 1995;10:127-31. (b)
478. Wüster C, Harle U, Rehn U, Müller C, Knauf K, Köppler D, Schwabe C, Ziegler R. Benefits of growth hormone treatment on bone metabolism, bone density and bone strength in growth hormone deficiency and osteoporosis. *Growth Horm IGF Res*. 1998;8 Suppl A:87-94. Review.
479. Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, Motohashi M, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 1999;87:411-8.
480. Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent*. 2005;33:123-9.
481. Yasuda I. Fundamental aspects of fracture treatment. *Clin Orthop*. 1977;124:5-8.
482. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*. 1990;345:442-4.
483. Zang XY, Tan YB, Pang ZL, Zhang WZ, Zhao J. Effects of parathyroid hormone and estradiol on proliferation and function of human osteoblasts from fetal long bone. An in vitro study. *Chin Med J (Engl)*. 1994;107:600-3.
484. Zarychanski R, Elphee E, Walton P, Johnston J. Osteonecrosis of the jaw associated with pamidronate therapy. *Am J Hematol*. 2006;81:73-5.
485. Zhang R, An Y, Toth CA, Draughn RA, Dimaano NM, Hawkins MV. Osteogenic protein-1 enhances osseointegration of titanium implants coated with peri-apatite in rabbit femoral defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71:408-13.
486. Zhu T, Goh EL, LeRoith D, Lobie PE. Growth hormone stimulates the formation of a multiprotein signaling complex involving p130(Cas) and CrkII. Resultant activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem*. 1998;273:33864-75.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía
Bucofacial)



**OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL: EFECTO DE LA
ADMINISTRACIÓN LOCAL DE HORMONA DEL
CRECIMIENTO EN EL TEJIDO PERIIMPLANTARIO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elena Martín Monge

Bajo la dirección de los doctores

Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil
Luis Blanco Jerez
Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-2928-6**



OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE HORMONA DEL CRECIMIENTO EN EL TEJIDO PERIIMPLANTARIO

TESIS DOCTORAL

2008

Elena Martín Monge

Directores

Prof. Dr. JA Fernández-Tresguerres Hernández

Dra. I Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

Prof. Dr. Luis Blanco Jerez

*A mi familia, por las horas que he
dejado de estar con ellos, por su amor
y por haberme apoyado siempre.*

A José, que ya no está aquí para verlo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis:

Al Prof. Dr. Jesús A. Fernández-Tresguerres Hernández, por sus sabios consejos y por darme la oportunidad de participar en su grupo de investigación.

A la Dra. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil por enseñarme la constancia y la ilusión por el trabajo de investigación.

Al Prof. Dr. Luis Blanco Jerez, por creer en este proyecto y aportar sus habilidades quirúrgicas y conocimientos científicos.

Y como no, al Prof. Dr. José M^a Sada García-Lomas, por haber sido mi mentor, mi maestro y mi amigo e inculcarme el amor por la docencia. Allá donde estés, gracias.

También quiero agradecer:

A la Profa. Dra. Celia Clemente de Arriba el haberme permitido trabajar en su laboratorio, enseñarme las técnicas histomorfométricas y brindarme su ayuda cuando la he necesitado.

A la Profa. Rosa Rodríguez Torres por su colaboración desinteresada y sus conocimientos sobre densitometría.

A Maite García de Juan por su ayuda inestimable en el laboratorio y en el manejo del densitómetro.

A Profa. Conchita Alonso Rodríguez, porque casi sin conocerme, se volcó en el manejo estadístico de los resultados, muchísimas gracias.

Mi agradecimiento a todo el personal del Animalario de la UCM, en especial a la Dra. M^a Pilar Bringas de la Lastra, Directora Técnica.

Gracias a Juan López-Quiles, a Mónica Montiel y a Carlos Bohm, ellos también aportaron su granito de arena.

Reitero mi agradecimiento a mis padres y a mi hermano, a Toño y a mis pequeños Diego y Alicia, por su tiempo, su apoyo y su paciencia.

Y gracias en definitiva a todas aquellas personas que han hecho posible que este proyecto haya salido a la luz, a todas ellas, muchas gracias.

ÍNDICE

<i>Índice de acrónimos</i>	vii
1. Antecedentes y Justificación	1
2. Hipótesis de trabajo y Objetivos	9
3. Introducción	13
3.1. Hueso	15
3.1.1. <i>Biología ósea</i>	17
3.1.1.1. <i>Macroestructura</i>	17
3.1.1.2. <i>Microestructura</i>	18
A. Células óseas.....	18
B. Matriz orgánica.....	25
B1 Colágeno.....	26
B2 Proteínas no colágenas.....	27
C. Fase mineral.....	27
3.1.2. <i>Metabolismo óseo</i>	29
3.1.2.1. Homeostasis fosfocálcica.....	29
3.1.2.2. Remodelado óseo.....	29
3.2. Osteoporosis	53
3.2.1. <i>Definición</i>	55
3.2.2. <i>Clasificación</i>	57
3.2.3. <i>Epidemiología</i>	58
3.2.4. <i>Etiopatogenia</i>	61
3.2.5. <i>Clínica</i>	63
3.2.6. <i>Diagnóstico</i>	65
3.2.6.1. Medición de la densidad mineral ósea..	65
A. Radiología convencional.....	65
B. Absorciometría dual fotónica de RX (DEXA).....	65
C. Tomografía axial computarizada (TAC).....	65

cuantitativa (QCT).....	70
D. Ultrasonidos (US).....	70
E. Estudio calcemia, calciuria y fosfatemia.....	71
3.2.6.2. Medición de la microestructura.....	72
A. Histomorfometría.....	72
B. MicroTAC.....	75
3.2.7. <i>Tratamiento</i>	76
3.2.7.1. Revisión por grupos terapéuticos de los principales fármacos utilizados en la osteoporosis.....	76
3.3. <i>Hormona del crecimiento</i>.....	85
3.3.1. <i>Estructura química y mecanismo de acción...</i>	87
3.3.1.1. Biosíntesis y secreción. Generalidades.	87
3.3.1.2. Genes para GH.....	89
3.3.1.3. Proteínas transportadoras.....	89
3.3.1.4. Receptores de GH.....	90
3.3.1.5. Control de la secreción de GH.....	93
3.3.1.6. GHRH.....	94
3.3.1.7. Factores metabólicos y secreción de GH.....	96
3.3.1.8. Control central de la secreción de GH..	97
3.3.1.9. Somatomedinas (IGF).....	100
A. Estructura y distribución.....	100
B. Proteínas transportadoras.....	101
C. Receptores de IGF.....	102
D. Control de IGF-I.....	102
E. Acciones biológicas de IGF-I.....	103
3.3.2. <i>Acciones generales de la GH</i>	106
3.3.2.1. Acciones biológicas de GH.....	106
A. Crecimiento.....	106

B. Acciones lipolítica y diabetógena.....	110
C. Acciones sobre el equilibrio electrolítico.....	111
3.3.2.2. Otras acciones de la GH.....	114
3.3.3. Acciones de la GH sobre el hueso.....	117
3.3.3.1. Efectos de la GH sobre el crecimiento longitudinal óseo.....	117
A. La GH y la regulación del crecimiento óseo longitudinal postnatal.....	117
B. Papel fisiológico del IGF-I en el crecimiento óseo.....	118
C. Evaluación de la Teoría de la somatomedina vs. a la Teoría del efector dual.....	119
3.3.3.2. Efectos de GH <i>in vitro</i>	120
3.3.3.3. Efectos de la GH <i>in vivo</i> sobre el metabolismo óseo en animales.....	121
A. Efectos de la diferenciación y del tratamiento con GH sobre el hueso.....	122
B. Efectos del tratamiento con GH en los parámetros óseos de animales con secreción normal de GH.....	122
C. Efectos de la GH en la curación de fracturas..	124
3.3.3.4. Efectos de la GH en el metabolismo óseo en humanos.....	124
A. En pacientes con acromegalia y deficiencia de GH.....	124
B. Efectos del eje GH/IGF-I en el metabolismo óseo y en la masa ósea en pacientes con secreción normal de GH.....	127
4. Material y Metodología.....	131
4.1. Material.....	133
4.1.1. Animales de Experimentación.....	135

4.1.1.1.	Fase de osteoporosis experimental.....	135
4.1.1.2.	Fase de colocación de implantes y aplicación de GH.....	135
4.1.2.	<i>Material Quirúrgico.....</i>	136
4.1.3.	<i>Material para la densitometría.....</i>	136
4.1.4.	<i>Material de experimentación.....</i>	136
4.1.4.1.	Implantes.....	136
4.1.4.2.	Hormona del crecimiento.....	137
4.1.5.	<i>Material histológico.....</i>	137
4.2.	<i>Metodología.....</i>	139
4.2.1.	<i>Metodología de la osteoporosis experimental</i>	141
4.2.1.1.	<i>Animales de experimentación.....</i>	141
4.2.1.2.	<i>Medición de la densidad mineral ósea mediante DEXA.....</i>	141
4.2.1.3.	<i>Fase de ovariectomía más dieta hipocálcica.....</i>	144
4.2.1.4.	<i>Tratamiento estadístico de los resultados.....</i>	146
4.2.2.	<i>Metodología de la fase de colocación de implantes y GH.....</i>	146
4.2.2.1.	<i>Fase de ovariectomía (grupos experimentales).....</i>	146
4.2.2.2.	<i>Cirugía de colocación de implantes...</i>	146
4.2.2.3.	<i>Medición de la densidad mineral ósea mediante DEXA.....</i>	149
4.2.2.4.	<i>Preparación de muestras.....</i>	151
4.2.2.5.	<i>Análisis histomorfométrico.....</i>	153
	A. Microscopía óptica.....	153
	B. Morfometría.....	156
4.2.2.6.	<i>Tratamiento estadístico de los resultados.....</i>	158

5. Resultados.....	159
5.1. Resultados de la fase de osteoporosis experimental.....	161
5.2. Resultados de la fase de colocación implantes-GH.....	167
5.2.1. Análisis Histológico	170
5.2.2. Análisis Histomorfométrico	180
5.2.3. Análisis mediante DEXA	185
6. Discusión.....	191
7. Conclusiones.....	229
8. Bibliografía.....	233

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

1'25(OH)₂ D₃	1'25 – dihidroxivitamina D ₃ o calcitriol
¹²⁵I	Yodo 125
AA	Aminoácidos
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ALS	Unidad ácido lábil
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP	Fostasa alcalina
Arg-Gly-Asp (RGD)	Secuencia Arginina-glicina-asparagina
ATP	Adenosín trifostato
Bcl-2	Proto-oncogen del linfoma de células B
BIC	<i>Bone to impant contact</i> o Porcentaje de osteointegración
Bim	Proteína de dominio homólogo
BMP	Proteína morfogenética ósea
BMU	Unidades multicelulares básicas remodeladoras de hueso
BUA	Atenuación del sonido
Ca	Calcio
Cbfa1	Factor de transcripción de unión al núcleo o <i>core</i>
c-fos	Proto-oncogen perteneciente a la familia de los factores de transcripción
c-jun	Protooncogen nuclear activado por la vía de la JNK
Cm²	Centímetros cuadrados
CMO	contenido mineral óseo
c-myc	Protooncogen nuclear (<i>myc=myelocitomatosis</i>)
Comp.	Comprimidos
COX-2	Cicloxigenasa 2
	Se trata de una herramienta específica para los genes de los tejidos de animales
Cre/loxP	<i>Knock out</i> . Es la proteína recombinante del bacteriófago P1 que se une al loxP (<i>locus</i> del X-ing over)
CT	Calcitonina

CV	Coeficiente de variabilidad
D.E.	Desviación estándar
DA	Dopamina
DCA	DMO de la región CALOTA antes de la OVX menos DMO de la CALOTA tras la OVX,
DCO	DMO de la COLUMNA antes de la OVX menos DMO de la COLUMNA tras la OVX
DMO	Densidad mineral ósea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Absorciometría dual fotónica
DTI	DMO de la región TIBIA antes de la OVX menos DMO de la TIBIA tras la OVX
DXA / DEXA / QDR	Densitometría radiológica de doble energía axial o absorciometría dual de RX
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
e-PTFE	Politetrafluoroetileno expandido
erg1	Gen relacionado con <i>ether-a-go-go</i> 1
ERK	Proteína-kinasa regulada por señal extracelular o del mitógeno activado
<i>et al</i>	Abreviatura de la expresión latina <i>et alii</i> que significa “y otros”
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administración de fármacos y alimentos
FFA	Ácidos grasos
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
g	Gramos
GABA	Ácido gamma amino butírico
GCs	Glucocorticoides
GGPP	<i>Geranyl-geranyl</i> difosfato
GH	Hormona del crecimiento
GHBP	Proteína transportadora de GH
GHD	Deficiencia de GH
GH-N/V	Genes para GH N/V
GHR	Receptor de GH
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento

GM-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos
H⁺	Ión hidrógeno
HA	Hidroxiapatita
HA-GHBP	Proteína transportadora de GH de alta afinidad
hGH	Hormona del crecimiento humana
hMSC	Células troncales mesenquimáticas humanas
ICTP	Telopéptido carboxi-terminal del procolágeno
IFN-γ	Interferón
IGFBP	Proteínas de unión del IGF
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina, tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina, tipo II
IL	Interleuquina
INTP	Telopéptido amino-terminal del procolágeno
IRS1, -2	Substratos -1, -2, del receptor insulínico
JAK	Es un tipo de factor de transcripción
JNK	Janu-kinasa
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
LA-GHBP	Proteína transportadora de GH de baja afinidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LIFT	Estudio a largo plazo sobre el efecto de la tibolona en las fracturas
LPR5	Receptor de lipoproteínas de baja densidad 5
M-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de macrófagos
mg	Miligramos
mmp1B	Metalopeptidasa de la matriz 1B (colagenasa intersticial)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MT1-MMP	Metaloproteína 14 de la matriz
N.S.	No estadísticamente significativo
Na	Sodio

OB	Osteoblastos
OC	Osteoclastos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	Proteína osteogénica
OPG	Osteoprotegerina
Ostn	Osteocrina
OVX	Ovariectomía, ovariectomizado/a
P	Fósforo
p.e. / ej.	Por ejemplo
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PGE	Prostaglandinas
PHI	Péptido histidina isoleucina
PI-3K	Fosfoinositol 3-kinasa
PICP	Propéptido carboxi-terminal del procolágeno
PINP	Propéptido amino-terminal del procolágeno
PTH	Paratohormona y hormona paratiroidea
QCT	Tomografía computarizada cuantitativa
QDR/ DXA / DEXA	Densitometría radiológica de doble energía axial o absorciometría dual de RX
QUS	Ultrasonido cuantitativo
RA	Absorciometría radiológica / fotodensitometría
RANK	Receptor del ligando NF κ B
RANKL	Factor de diferenciación osteoclástica
rhGH	Hormona del crecimiento recombinante humana
RX	Rayos X
SERMS	Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos
SPA	Absorciometría fotónica simple
SS	somatostatina
STAT	Transductor de la señal y activador de transcripción
SXA	Absorciometría por RX de energía simple
T₃	Triyodo tironina

TAC	Tomografía axial computarizada
TC	Tomografía computarizada
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
THS	Terapia hormonal sustitutiva
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
TRAP	Fosfatasa tartrato resistente
U.I.	Unidades internacionales
UAH	Universidad de Alcalá
UCM	Universidad Complutense de Madrid
US	Ultrasonidos
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VOS / SOS	Velocidad del sonido
wk	Kilo de peso
Wnt	Es un tipo de factor de crecimiento aislado en la mosca <i>drosophila</i> sin alas (<i>Wingless</i> + gen <i>int</i>)
μg	Microgramo

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La sustitución de los dientes perdidos mediante implantes osteointegrados constituye uno de los avances odontológicos más importantes de las últimas décadas y es la rama de la Odontología que más se ha desarrollado en los últimos 15 años. Existen una serie de factores combinados que fomentan la necesidad y el empleo de estos tratamientos. Una población cada vez más envejecida y con una esperanza de vida mayor, a la que se asocia una pérdida de dientes causada por la edad y las alteraciones estéticas y psicológicas de la misma, exige tratamientos que reestablezcan su silueta, función, comodidad, estética, habla y salud normales; sin embargo, cuanto mayor es el número de dientes que faltan y mayor es el tiempo de edentación, más difícil es alcanzar los objetivos estéticos y funcionales respecto a la odontología tradicional. Por otro lado, los fracasos en las prótesis convencionales (fijas y removibles) frente a los resultados predecibles y las ventajas de las rehabilitaciones sobre implantes justifican la utilización de los mismos (Mich, 2006).

Para el éxito del tratamiento implantológico es imprescindible la unión firme, estable y duradera del implante al sustrato óseo, es decir, es imprescindible la presencia de una cantidad y calidad mínimas de hueso. El hueso alveolar ligado genéticamente a los dientes va reabsorbiéndose tras las exodoncias debido a la falta de estimulación del hueso residual, lo que origina una disminución de las trabéculas y de la densidad ósea en dicha zona, con pérdida de la anchura externa y luego de la altura del volumen óseo (Pietrokovski, 1975). La anchura del hueso disminuye una cuarta parte durante el primer año tras la pérdida del diente, y unos 4mm de altura media durante ese primer año tras realizar las extracciones (Carlsson, 1967). La pérdida de hueso, aunque a menor velocidad, continúa durante toda la vida.

En consecuencia, en los ancianos, el hueso alveolar está muy disminuido y además de tener reducida la capacidad de regeneración (Sodeck y Cheifetz, 2000) necesaria para

una correcta osteointegración de las fijaciones de titanio, es habitual encontrar una patología concreta, como es la osteoporosis, que se define como una enfermedad sistémica esquelética caracterizada por una masa ósea disminuida con una alteración de la microestructura del hueso, con una disminución del grosor de la cortical y con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad a las fracturas (Osorio y *et al.*, 2003). Por tanto, como parte del proceso natural del envejecimiento, los huesos comienzan a reabsorberse más rápido de lo que las células pueden formar hueso nuevo. La osteoporosis es el proceso metabólico óseo más frecuente y uno de los mayores problemas de salud pública en el momento actual. La incidencia de esta enfermedad aumenta de forma geométrica con la edad, y es más frecuente en el sexo femenino. La pérdida ósea se acelera en las mujeres tras la menopausia, debido a la caída en los niveles de estrógenos. Se estima que hay aproximadamente 400 millones de mujeres en el mundo que están incapacitadas de alguna manera a consecuencia de la osteoporosis postmenopáusica (Kong y Penninger, 2000), y aunque es cuatro veces más frecuente en ellas, los varones también se ven afectados. Según Kanis, una de cada tres mujeres mayores de 65 años padece esta enfermedad (Kanis, 1996).

Se ha investigado sobre la asociación entre el estado del hueso alveolar y la masa ósea en otras localizaciones esqueléticas, ya que si la osteoporosis afecta fundamentalmente a las vértebras y a los huesos largos, también podría evidenciarse en otras partes de la economía, incluyendo los huesos maxilares, ya que en estudios en ratas ovariectomizadas se ha demostrado que el déficit estrogénico a largo plazo disminuye el grosor de la cortical mandibular (Yang *et al.*, 2005). Se ha intentado evaluar la osteoporosis en los huesos maxilares mediante distintos mecanismos (White y *et al.*, 2005), pero los resultados obtenidos son controvertidos, probablemente debido a las diferencias en los métodos de medición (Bodic y *et al.*, 2005). Se sabe que los factores mecánicos

(estabilidad primaria) y biológicos (capacidad de regeneración) implicados en los procesos de osteointegración están ciertamente alterados en la osteoporosis postmenopáusica y senil (Marco y *et al.*, 2005) y muchos clínicos e investigadores han observado que la curación ósea con biomateriales es más lenta en los sujetos osteoporóticos, con un aumento de la tasa de fracasos de los tratamientos implanto-protésicos (Fini y *et al.*, 2004; Duarte y *et al.*, 2005). En la literatura se describe que la presencia de osteoporosis puede alterar los procesos reparativos alrededor de los implantes (Fujimoto *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1997; Lugero *et al.*, 2000).

La medición de la densidad mineral ósea en la osteoporosis mediante el análisis con absorciometría dual fotónica de rayos X (DEXA) es una herramienta de gran precisión superior a otros procedimientos no invasivos (Guglielmi, 1995; Lang *et al.*, 1991; Faulkner *et al.*, 1991). Estudios comparativos han demostrado una excelente correlación en las medidas *in vivo* e *in vitro* de la masa ósea entre las distintas generaciones de sistemas DEXA (Faulkner *et al.*, 1991, 1993; Dal Mas *et al.*, 2002) obtenidas mediante el densitómetro Norland XR-26 ® (versión 2.3) que se ha utilizado en este trabajo

Es bien sabido que la hormona del crecimiento tiene una gran importancia en el crecimiento longitudinal del hueso y que estimula la diferenciación y proliferación de los osteoblastos *in vitro*, seguramente interactuando con las células progenitoras (Kassem *et al.*, 1994) y a través del IGF tiene acción anabólica sobre los mismos. También regula la formación de osteoclastos, tanto el mecanismo estimulador como el inhibidor, probablemente debido a las diferencias existentes en las condiciones de los cultivos (Nishiyama *et al.*, 1996. Mochizuki *et al.*, 1992) y actúa en la estimulación de células fagocíticas (Warwick *et al.*, 1995).

Por otro lado, se ha visto que el envejecimiento humano causa cambios en la composición corporal (atrofia muscular y aumento de la grasa), una disminución de la

densidad mineral ósea, un deterioro de la forma física y un empeoramiento del perfil de riesgo cardiovascular, con aumento de la morbilidad y mortalidad. Además, la secreción endógena de GH y de IGF disminuye de forma fisiológica con la edad, sobre todo a partir de los 60 años, por lo que el envejecimiento podría considerarse como una forma de déficit de GH (Toogood, 2004). Parte de estas situaciones revierten con la administración de GH exógena (Marcus *et al.*, 1990; Rudman *et al.*, 1990), aunque su uso sistémico es todavía controvertido (Toogood, 2004).

En pacientes con déficit de GH se produce una disminución de la densidad mineral ósea igual que ocurre en la vejez (Rosen y *et al.*, 1993), y la administración de GH sistémica consigue aumentar los valores séricos de calcio, fosfato y osteocalcina (Whitehead y *et al.*, 1992; Holmes y *et al.*, 1995), además de acelerar el *turn-over* óseo, ya que incrementa la síntesis de proteínas (sobre todo las de la matriz ósea) y la mineralización (Degerblad *et al.*, 1995; Canalis y *et al.*, 1989).

En cuanto a la curación de fracturas, se ha demostrado en diversos experimentos animales que la administración sistémica de GH tras la fractura tibial experimental consigue aumentar la rigidez y la capacidad de carga (Bak *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 1991), tanto si se da al principio del tratamiento como si se administra a lo largo de toda la terapia (Bak *et al.*, 1991) y que se estimula la formación del callo de fractura y la osificación en las etapas tempranas de la curación ósea (Kolbeck *et al.*, 2003), encontrando resultados similares en estudios con animales viejos (Bak y Andreassen, 1991; Andreassen *et al.*, 1995).

Pero sus efectos sobre la osteointegración de fijaciones de titanio en situaciones de osteopenia / osteoporosis aplicada de forma local está muy poco estudiada (Guicheux *et al.*, 1998; Blom *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005).

Se han desarrollado diferentes modelos animales para determinar la relación entre la pérdida de hueso y la osteoporosis. El animal ovariectomizado (OVX) se ha utilizado ampliamente como modelo de osteoporosis postmenopáusica, ya que la osteopenia que se desarrolla tras la ovariectomía tiene muchas similitudes con la que se produce en los humanos (Cao y *et al.*, 2001; 2004). El modelo de rata ovariectomizada ha sido el más utilizado (Fini *et al.*, 2004; Namkung-Matthai *et al.*, 2001, Ortoft y Oxlund, 1996; Duarte *et al.*, 2005). Narai y Nagahata (2003) publicaron que es posible la colocación de implantes en la rata ovariectomizada suministrándole el tratamiento de la osteoporosis. Sin embargo, el conejo parece un modelo más apropiado para el estudio del pico de masa ósea, porque al contrario de lo que sucede en los roedores, los conejos terminan de crecer y exhiben madurez esquelética (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Mori *et al.*, 1997; Norris *et al.*, 2001). Los modelos experimentales de osteoporosis en conejo pueden ser muy útiles, especialmente para investigar agentes con propiedades anabólicas. La administración de corticosteroides y la ovariectomía son los principales modelos de osteoporosis experimental descritos en conejos (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Fujimoto *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005; Mori *et al.*, 1997), pero la inducción de la enfermedad mediante ovariectomía asociada a la dieta hipocálcica en conejos ha sido muy poco estudiada (Mori *et al.*, 1997; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005) y la medición de la DMO mediante DEXA con el aparato NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) no ha sido investigada con anterioridad.

Por todo lo expuesto, creemos que está justificada la realización de esta Tesis Doctoral.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJOS Y OBJETIVOS

En el presente estudio nos planteamos la siguiente **HIPÓTESIS DE TRABAJO**:

La aplicación de una dosis única de 2 U.I. de hormona de crecimiento recombinante humana en el interior del lecho quirúrgico, inmediatamente antes de la inserción de un implante de titanio en la tibia de conejas, a las que se ha inducido un proceso osteoporótico experimental previo mediante ovariectomía y dieta hipocálcica, mejora el proceso de osteointegración.

Con el fin de dar respuesta a esta hipótesis, se desarrolló un trabajo experimental en animales de investigación para alcanzar los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Cuantificar mediante DEXA *in vivo* la DMO en calota, columna y tibia de conejas Nueva Zelanda a las que se ha ovariectomizado y sometido a dieta hipocálcica.
2. Evaluar que en este modelo de osteoporosis se produce la osteointegración a las dos semanas de la inserción de un implante de titanio roscado colocado en el tibia de las conejas, de forma cualitativa (mediante análisis histológico).
3. Valorar de forma cuantitativa, mediante análisis histomorfométrico del hueso en contacto íntimo con el implante (*BIC*) y mediante análisis densitométrico (DEXA) la influencia de la aplicación local de hormona de crecimiento en la osteointegración en un modelo experimental de osteoporosis.
4. Comparar el efecto de la hormona de crecimiento recombinante humana, desde el punto de vista densitométrico, histológico e histomorfométrico entre animales con osteoporosis experimental inducida y animales sanos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. HUESO

3.1.1. BIOLOGÍA ÓSEA

El hueso es un tejido dinámico, que está en constante formación y destrucción. Desde un punto de vista histológico, es un tejido conjuntivo mineralizado, que está constituido por laminillas de matriz ósea calcificada. Según sea la disposición de éstas, puede ser hueso cortical (laminillas concéntricas formando osteonas) o hueso trabecular (laminillas formando trabéculas).

Constituye el soporte estructural para el cuerpo, protegiendo los órganos internos y alojando la médula ósea en su interior. También funciona como reservorio de iones calcio y fosfato y juega un importante papel en la homeostasis de estos minerales.

3.1.1.1. *Macroestructura:*

Aproximadamente el 80% del esqueleto se compone de **hueso cortical**, que se localiza principalmente en las diáfisis de los huesos largos y en las superficies de los planos. Se trata de hueso compacto, que se deposita de forma concéntrica alrededor de los canales o sistemas Harvesianos, que contienen los vasos sanguíneos, el tejido linfático, los nervios, y el tejido conectivo. El **hueso trabecular** o esponjoso se encuentra principalmente en las epífisis de los huesos largos y en el interior de los huesos cortos, y consta de láminas y celdas interconectadas en cuyo interior se aloja la médula ósea (Wheater *et al.*, 1987). Se halla ordenado en función de las fuerzas de tensión, dotando al armazón óseo de rigidez y resistencia a la compresión.

La ratio superficie/volumen del hueso esponjoso es mucho mayor que en el hueso cortical y, por tanto, el potencial de la actividad metabólica es superior.

3.1.1.2. *Microestructura:*

Tanto el hueso compacto como el trabecular están constituidos por células (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), matriz orgánica y sustancia mineral.

A. Células

En el hueso hay osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Sin embargo, debido a la proximidad de la médula ósea, el hueso está expuesto a la influencia de otro tipo de células que juegan un papel importante tanto en la producción de células osteogénicas como en la regulación del remodelado.

A.1. Los **osteoblastos** son células grandes, de forma poliédrica, con citoplasma basófilo, aparato de Golgi prominente y con un retículo endoplásmico rugoso importante, esencial en la síntesis de proteínas. Pueden ser activos o inactivos (también llamados de revestimiento o células limitantes). Los primeros sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide. Poseen como enzima característica la fosfatasa alcalina. Son células polarizadas, dispuestas en empalizada sobre la matriz y actúan coordinadamente, debido al contacto entre células que tiene lugar a través de unas proteínas transmembrana denominadas “integrinas”, que actúan de enlace entre células o entre la célula y la matriz extracelular (Steinberg *et al.*, 1994). En el caso de los osteoblastos el mediador de la conexión intercelular es la Conexina 43 (Civitelli *et al.*, 1993).

Derivan de las células mesenquimales pluripotenciales (*stem cells*), que pueden diferenciarse también a condrocitos, adipocitos, mioblastos y fibroblastos (Kahn *et al.*, 1995; Connolly, 1995; Sodek y Cheifetz, 2000; Bianco y Gehron Robey, 2000; Friedenstein, 1976; Owen, 1985; Owen y Friedenstein, 1988) (Fig. 1).

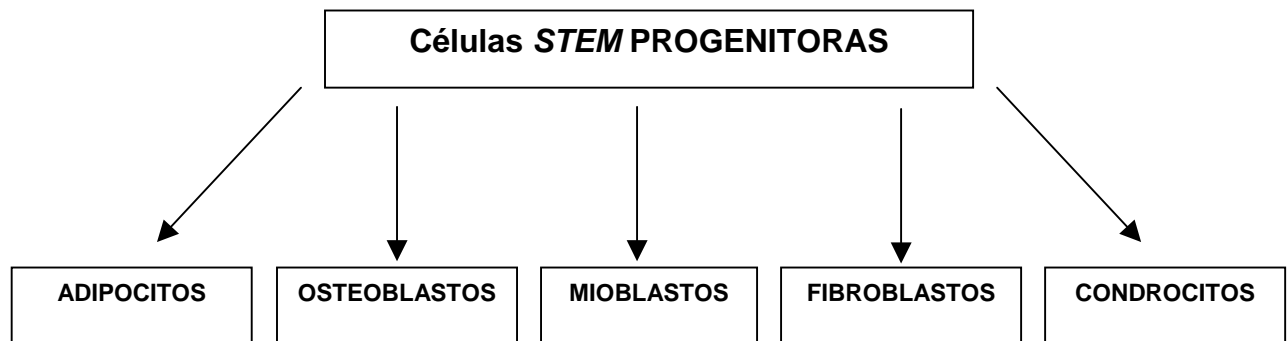


Figura 1. Estirpes celulares desde las *stem cell* mesenquimales pluripotenciales. (Modificado de Compston, 2001)

Se ha descubierto recientemente que el Cbfa 1 (factor de transcripción de unión al *core*) también conocido como Runx2 es esencial para la diferenciación osteoblástica; así, los ratones *knock out* para este gen muestran la ausencia total de osificación del cartílago (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Karsenty 2001) y en humanos la pérdida heterocigótica de esta función causa la displasia cleidocraneal (Mundlos *et al.*, 1997). Además, se necesitan otros factores para la diferenciación normal de los osteoblastos, incluyendo los FGFs, TGF- β , BMPs, glucocorticoides, y 1,25-dihidroxivitamina D (Prieto 1992; Sykaras y Opperman, 2003).

Los osteoblastos que están implicados activamente en la formación ósea se disponen en monocapas de células cuboides-redondeadas en yuxtaposición al hueso neoformado no mineralizado (osteóide) (Steinberg *et al.*, 1994). Los osteoblastos a medida que se diferencian, expresan en su superficie diferentes proteínas o marcadores de diferenciación, como son colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteopontina, y osteocalcina. Muy recientemente, Bord *et al.* (2005) han demostrado la presencia de una molécula activa en el tejido óseo humano, la osteocrina (Ostn), una nueva proteína ósea que se expresa en

los osteoblastos del hueso en formación, y en los puntos de remodelado óseo, lo que sugiere según los autores, un papel importante en la formación ósea. Se puede utilizar como marcador de las células osteoblásticas (se expresa más en los osteoblastos jóvenes) y parece estar relacionada con la actividad de los mismos. Los osteoclastos no se tiñen con osteocrina. En los osteoblastos humanos, la osteocrina sigue un patrón de expresión opuesto al de la fosfatasa alcalina (Bord *et al.*, 2005).

Los osteoblastos que están en periodo de formación activa pueden sufrir apoptosis, transformarse en células limitantes en la superficie ósea o convertirse en osteocitos; trabajos muy recientes sugieren que el TGF β , la metaloproteinasa 14 de la matriz (MT1-MMP) y la esclerostina (Winkler *et al.*, 2005, 2003; Sutherland *et al.*, 2004) pueden actuar como mediadores en este proceso de diferenciación, ya sea de forma individual o en conjunto (Karsdal *et al.*, 2002, 2004); la hilera de células limitantes junto con la membrana forman una capa protectora sobre la superficie y juegan un papel importante en la activación del remodelado óseo (Bord *et al.*, 1996). Un dato interesante es que los osteoblastos, en ciertas zonas del hueso, aparentemente en los puntos de incorporación a la matriz ósea como osteocitos, se tiñen positivamente para la osteocrina, mientras que los osteoblastos de alrededor no muestran tinción, lo que sugiere que posiblemente la Ostn pueda ser un factor de diferenciación del osteoblasto hacia osteocito. Esta inmunorreactividad se mantiene en los osteocitos recién incorporados a la matriz, pero se pierde en los que llevan más tiempo incluidos (Bord *et al.*, 2005).

Respecto a las acciones de los osteoblastos sabemos que (Prieto, 1992):

- a) sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso,
- b) dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular,
- c) contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina,

- d) a través de la síntesis de citoquinas específicas median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos (IL-1,-6 y -11) y en la hematopoyesis (GM-CSF y M-CSF) (Jilka, 1998. Girasole *et al.*, 1994) y
- e) sintetizan factores de crecimiento (PDGF, TGF- β , IGF-I y II).

A.2. Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en **osteocitos**. Éstos son las células más abundantes en la matriz ósea, tienen forma estrellada-aplanada y se sitúan en el interior de lagunas u osteoplasmas, donde se aloja el cuerpo celular y sus prolongaciones citoplasmáticas conectan unas células con otras y con los osteoblastos de la superficie, formando una red a través de los conductos calcóforos; estos conductos están llenos de fluido óseo extracelular con una concentración de calcio y fosfato menor que la del plasma. A través de estas proyecciones se forma un sincitio de células interrelacionadas (vía uniones *gap*), que permite a los osteocitos responder a los estímulos mecánicos de las cargas y transformarlos en señales químicas; a este fenómeno se le conoce como mecanotransducción (Langer 1993; Lanyon 1993). También intervienen en la maduración y mineralización de la matriz (Bilezikian *et al.*, 1996). Al final, los osteocitos terminan de diferenciarse y pueden sufrir apoptosis o ser fagocitados durante el proceso de reabsorción osteoclástica. La esclerostina, que se expresa fuertemente en los osteocitos, es un antagonista de las BMPs, que produce una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina y de la proliferación de las células hMSC, disminuyendo la actividad de los osteoblastos y la diferenciación de los osteoprogenitores y suprimiendo la mineralización de los osteoblastos, por tanto, controlando de forma selectiva la apoptosis celular y la homeostasis ósea (Winkler *et al.*, 2005, 2003; Sutherland *et al.*, 2004).

Se cree que los osteocitos juegan un papel esencial en la respuesta frente a los estímulos mecánicos percibiendo las tensiones mecánicas e iniciando la respuesta apropiada (remodelado o modelado) mediante una serie de mensajeros químicos entre los que están: glucosa 6-fosfatasa deshidrogenasa, el óxido nítrico, y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs).

A.3. Las células encargadas de la reabsorción son los **osteoclastos**. Son células grandes y multinucleadas y derivan de los precursores hematopoyéticos de la línea celular monocito / macrófago (Mundy 1991). Se forman por la fusión de células mononucleares y se caracterizan por la presencia de un borde dentado, consecuencia de las complejas invaginaciones de la membrana plasmática, y un citoesqueleto prominente. Son ricos en enzimas lisosómicas, entre las que destacan la fosfatasa tartrato-resistente (TRAP), la colagenasa y las catepsinas. Durante el proceso de reabsorción ósea, los iones hidrógeno (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II se liberan a través de la membrana plasmática mediante una bomba de protones para disolver el mineral óseo. Posteriormente se liberan las enzimas lisosómicas, como la colagenasa y las catepsinas, que degradan la matriz ósea. Es necesario que los osteoclastos se adhieran a la superficie ósea para que se pueda llevar a cabo la reabsorción, adhesión que está mediada por integrinas, en particular la $\alpha v \beta 3$, que se une a las proteínas de la matriz que contienen la secuencia RGD (Horton *et al.*, 1991); entre los ligandos potenciales se encuentran la osteopontina (Denhardt y Noda, 1998), la sialoproteína ósea, la tromboespondina, la osteonectina, y el colágeno tipo I. Morfológicamente, la unión de los osteoclastos a la superficie ósea se percibe como un anillo captador de actina (Lakkakorpi y Vaananen, 1995) que rodea por completo la membrana dentada de la célula.

Se conoce desde hace tiempo que las células osteoblásticas son esenciales para la osteoclastogénesis. Se ha publicado recientemente que el factor de diferenciación osteoclástica (RANKL) es un activador del receptor del ligando NF_κB (RANK). El RANK es una proteína de transmembrana tipo 1 expresada por los osteoclastos (Troen, 2003; Anderson *et al.*, 1997). La interacción del RANKL con RANK activa una cascada de acontecimientos intracelulares que implica la activación del NF_κB y la protein-quinasa JNK y la interacción con los factores asociados al receptor TNF (TRAF_S) (Hofbauer *et al.*, 2000); se produce un aumento de la actividad y del número de osteoclastos. Por otro lado, la osteoprotegerina (OPG), un nuevo miembro de la superfamilia de los receptores de TNF (que se expresa en células del estroma ST2, de médula ósea y en osteoblastos), actúa como un receptor soluble que evita que el RANKL se una y active el RANK en la superficie del osteoclasto (Kong *et al.*, 1999). La producción del M-CSF por parte de las células osteoblásticas del estroma también es esencial para la osteoclastogénesis (Yoshida *et al.*, 1990), aunque al contrario que el RANKL, no parece tener efecto sobre la actividad osteoclástica (Udagawa *et al.*, 1999) (Fig. 2).

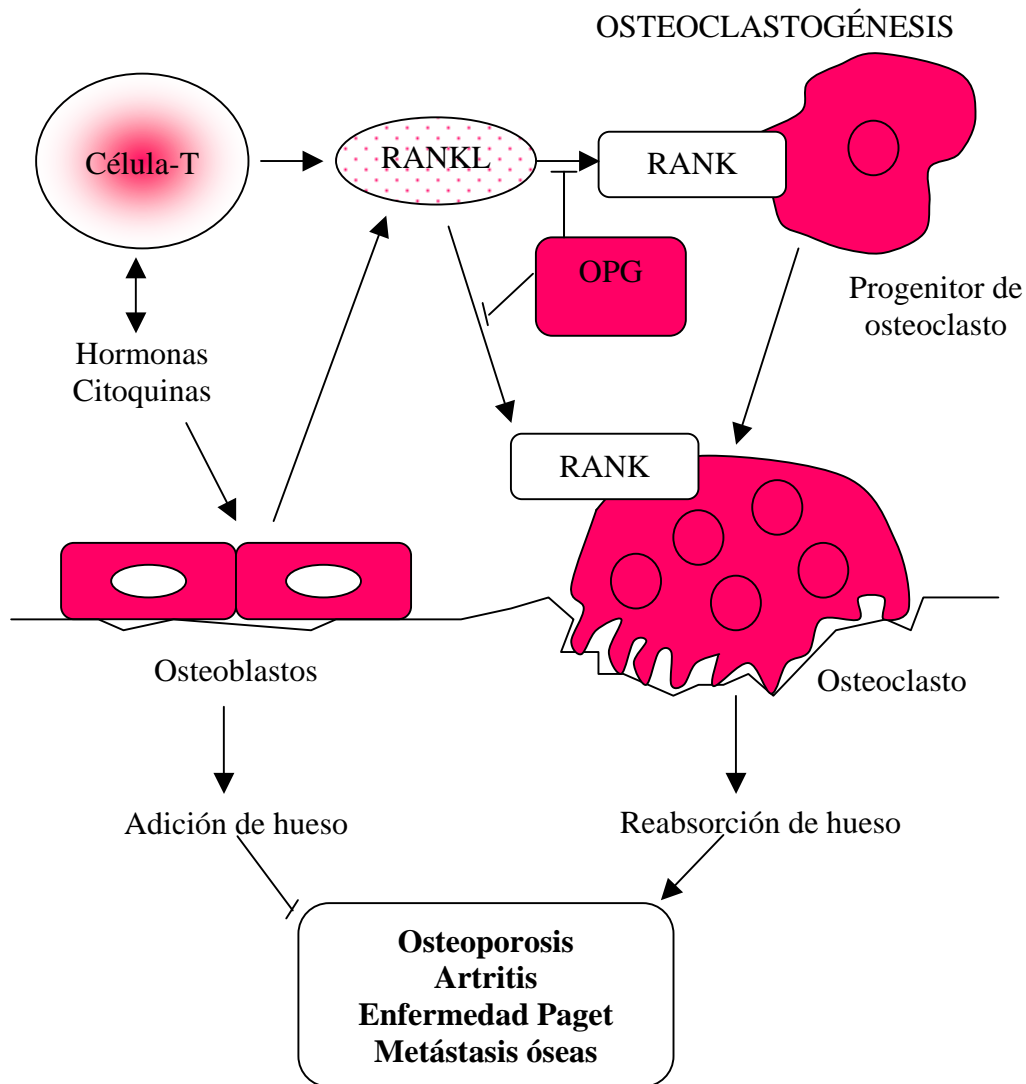


Figura 2. Control molecular del remodelado óseo. (Modificado de Kong y Penninger, 2000).

La apoptosis osteoclástica es un marcador muy importante de la actividad osteoclástica. Al igual que los osteocitos, los osteoclastos son células muy diferenciadas con una esperanza de vida limitada. Las citoquinas IL-1, TNF- α y M-CSF, reducen la apoptosis osteoclástica (Suda *et al.*, 1997) prolongando por tanto la viabilidad de dichas células. Por el contrario, los estrógenos incrementan la apoptosis osteoclástica (Saintier *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado que la apoptosis osteoclástica está regulada por la actividad del ERK, que media en la diferenciación y maduración de los osteoclastos - la fosforilación del ERK es fundamental para la supervivencia de los mismos (Ang *et al.*, 2007)- y por el Bim (un tipo de proteína de dominio homólogo) de la familia del Bcl-2 que regula la vía de la apoptosis mitocondrial y que se expresa en células epiteliales, hematopoyéticas, neuronales y germinales (Akiyama *et al.*, 2005).

A.4. En las áreas de reabsorción se encuentran los **monocitos** y **macrófagos**, que liberan sustancias estimuladoras de la reabsorción: GM-CSF, TNF- α e IL-1, -6 y -11. Además se pueden hallar **linfocitos**, productores de Interferón- γ que se encargan de inhibir la diferenciación de los osteoclastos y la acción de la IL-1; pero que también fabrican TNF- β , que al igual que el α , estimula la reabsorción (Hurley *et al.*, 1998).

B. *Matriz orgánica*

Fue Virchow en 1853 el primero en describir la matriz orgánica o **sustancia osteoide**, que supone un tercio del peso total del hueso. Está constituida principalmente por proteínas, de las cuales la más abundante es el **colágeno** (90%) (Tabla I).

Tabla I. Proteínas de la matriz osteoide (Tresguerres, 1999)	
COLÁGENO	90%
PROTEOGLICANOS	1%
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ CARBOXY-GLUTÁMICO	1.7%
GLICOPROTEÍNAS	3.7%
ALBÚMINA	0.3%

B.1. Colágeno

En un 90% está formado por colágeno tipo I y existen pequeñas proporciones de colágeno tipo III y V, probablemente procedentes de los vasos sanguíneos que vascularizan el hueso (Gehron Robey *et al.*, 1993). En el colágeno se hallan los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo este último un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno. Se ha comprobado que su tasa de excreción urinaria se relaciona directamente con la cantidad de reabsorción ósea (Schonau y Rauch, 1997). El colágeno contiene la secuencia RGD que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas (Gehron Robey *et al.*, 1993). La unidad de colágeno o tropocolágeno está constituida por tres cadenas polipeptídicas, dos alfa-1 y una alfa-2. Las fibrillas de colágeno se forman por la unión de varias moléculas de tropocolágeno gracias a la glicosilación y formación de enlaces y a su vez, estas fibrillas se agrupan para formar haces y varios haces constituyen las fibras de colágeno. Finalmente, éstas se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y por la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas.

Puesto que el colágeno no tiene afinidad por el calcio, son otras proteínas las implicadas en el depósito mineral (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, etc.)

B.2. Proteínas no colágenas

Son las siguientes (Tabla II):

Tabla II. Proteínas no colágenas de la matriz (Tresguerres, 1999)	
PROTEOGLICANOS	<ul style="list-style-type: none"> • CONDROITIN SULFATO • DECORINA • BIGLICANO • HIALURONANO
PROTEÍNAS con ácido γ -CARBOXI-GLUTÁMICO	<ul style="list-style-type: none"> • OSTEOCALCINA • PROTEÍNA de la matriz con ácido γ-carboxi-glutámico
GLICOPROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none"> • OSTEONECTINA • FOSFATASA ALCALINA • PROTEÍNAS con RGD: <ul style="list-style-type: none"> FIBRONECTINA TROMBOSPONDINA OSTEOPONTINA VITRONECTINA SIALOPROTEÍNAS ÓSEAS
PROTEÍNAS del plasma	<ul style="list-style-type: none"> • ALBÚMINA • 2-SH- glicoproteína
FACTORES DE CRECIMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I y II • TGF-β • PDGF

C. Fase mineral

El componente mineral supone un 65% del peso del hueso. Lo constituyen fundamentalmente calcio, fosfato y carbonato en diferentes proporciones (10:6:1) que precipitan en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y en menor proporción, magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. Aunque la hidroxiapatita es la principal fase mineral del hueso, también se hallan cristales de brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y de fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Pérez Casas y Bengoechea, 1975). Los

prismas de hidroxiapatita, de forma hexagonal, se adaptan a la orientación de las fibras de colágeno. Por otra parte, debido a la sobresaturación de calcio y fósforo del plasma respecto a la hidroxiapatita, deben existir sustancias que inhiban la mineralización, como los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato, siendo las proteínas con capacidad adhesiva las que la favorecen (Posner, 1985).

Los osteoblastos son los encargados de mineralizar la matriz ósea, ya que controlan la presencia de las proteínas que inhiben y/o fomentan la mineralización y regulan localmente la concentración de iones (Prieto, 1992). El primer paso es la síntesis de osteoide por parte de los osteoblastos, sustancia que se va acumulando en unas vesículas, en las que además hay fosfatasa alcalina y fosfolípidos ácidos con afinidad por el calcio; posteriormente entran en contacto con la cara interna de la membrana celular osteoblástica. Se produce la hidrólisis de los ésteres fosfóricos y se libera fosfato, imprescindible para que se origine el mineral de fosfato cálcico amorfo, que cristaliza posteriormente. Tras el acúmulo masivo de cristales, llega un momento en que se perforan las finas paredes de la vesícula y salen al exterior, precipitando entre las fibrillas de colágeno. Puesto que estas fibras no tienen afinidad por el calcio ni el fosfato, en el interior de las vesículas se encuentran unas proteínas no colágenas que favorecen la rápida cristalización del mineral (en cuanto se desprende de la vesícula) y su depósito sobre el tejido osteoide (osteopontina, osteocalcina y sialoproteína ósea).

La primera fase de la mineralización que supone un 65%, depende de la acción de los osteoblastos, pero la segunda fase (35%) consiste en el crecimiento de los cristales durante meses, por tanto es un proceso acelular (Roberts, 1988).

3.1.2. METABOLISMO ÓSEO

Conformar el esqueleto, dar soporte al organismo y albergar el 99% del calcio, que en un adulto sano supone un kilogramo, son las funciones más importantes que posee el hueso; esto es: función estructural, y homeostasis fosfocálcica. Asimismo, el tejido óseo se halla en constante formación y destrucción, fenómeno denominado remodelado.

3.1.2.1. *Homeostasis fosfocálcica*

Se sabe que la reabsorción ósea libera calcio al plasma y que el hueso participa en el transporte de calcio desde el fluido óseo al espacio extracelular. La red de canalículos bañada por este fluido, llega hasta las células de revestimiento, que forman como una membrana en la superficie ósea. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual sale el calcio a través de dicha membrana, pero el hecho es que el calcio abandona el hueso hacia el espacio extracelular (Carmeliet *et al.*, 2003), en función de las necesidades sistémicas.

3.1.2.2. *Remodelado óseo*

El **remodelado** óseo es un fenómeno de superficie. Sirve para mantener la integridad mecánica del esqueleto adulto así como para establecer un mecanismo por el cual los iones calcio y fosfato puedan ser liberados o permanecer en el interior del esqueleto. Consiste en la remoción, por parte del osteoclasto, de un *quantum* de hueso seguido de la formación por parte de los osteoblastos, de tejido osteoide, que posteriormente se mineraliza. Por tanto, la reabsorción siempre precede a la aposición (Fig. 3). Se dice que el esqueleto de un adulto, se renueva completamente cada 10 años.

El hueso está en constante formación y reabsorción lo que se conoce como **proceso de remodelado**. La actividad metabólica del hueso trabecular (25% del total del tejido

óseo) es unas diez veces mayor que la del hueso cortical (75%) debido a que la relación entre superficie y volumen es mayor (aproximadamente un 60% del total). Sin embargo, la superficie disponible para el remodelado (hueso trabecular y cortical endostal) es menor que la disponible para el intercambio iónico, en el que también interviene el fluido extracelular.

Las zonas donde se produce el remodelado óseo se conocen como unidades multicelulares básicas o *BMU* (Brixen *et al.*, 1993). En ellas se encuentran: osteoclastos, macrófagos, preosteoblastos y osteoblastos. Se cree que en los humanos la vida de expansión de cada unidad de remodelación está entre 2 y 8 meses, correspondiendo la mayoría de este periodo a la formación ósea (Parfitt, 1994).

En el humano adulto normal, aproximadamente el 20% de la superficie del hueso esponjoso está sufriendo un proceso de remodelado.

El primer paso en el remodelado implica la activación de la superficie ósea en reposo antes de la reabsorción (Fig. 3). Aunque no se conoce muy bien este proceso de activación, se cree que conlleva la retracción de las células lineales o en empalizada y la digestión de la membrana endostal, esto último posiblemente como resultado de la producción de colagenasa procedente de las células lineales (Bord *et al.*, 1996). Así, los precursores de los osteoclastos son atraídos por la superficie mineralizada expuesta y estimulados a convertirse en osteoclastos funcionales que reabsorben hueso. Se cree que la exposición de la superficie mineralizada mediante este proceso de activación es un requisito esencial para la reabsorción osteoclástica. La presencia de sinusoides capilares en la cercanía de las zonas de remodelado óseo sugiere que los osteoclastos podrían atravesar la pared vascular antes de la reabsorción, más que ser reclutados directamente por la matriz

ósea (Parfitt 1998). Existe una estrecha interdependencia entre la angiogénesis y la osteogénesis en el hueso en desarrollo (Gerber *et al.*, 1999; Horner *et al.*, 1999) una relación que también puede darse en el hueso adulto. Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la fase mineral y a descomponer la matriz osteoide, proceso que es finalizado por los macrófagos y permite la liberación de factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β y PDGF-BB (Lind *et al.*, 1995). Estos factores son quimiotácticos para los osteoblastos y promueven el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, estimulando además su proliferación (Mundy, 1993 b y 1995). Asimismo IGF-I y II y PDGF-AA podrían participar en el reclutamiento de preosteoblastos (Lind *et al.*, 1995), que sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs, responsables de su diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia orgánica que rellenará las zonas horadadas y posteriormente se producirá la mineralización de dicha matriz.

Todavía no se conocen qué factores determinan que en una zona concreta dé comienzo el remodelado. Sin embargo, es probable que la localización de la activación y el proceso de remodelado subsiguiente dependan estrechamente de factores mecánicos y las zonas de adelgazamiento trabecular puedan, por tanto, verse favorecidas (Compston *et al.*, 1989).

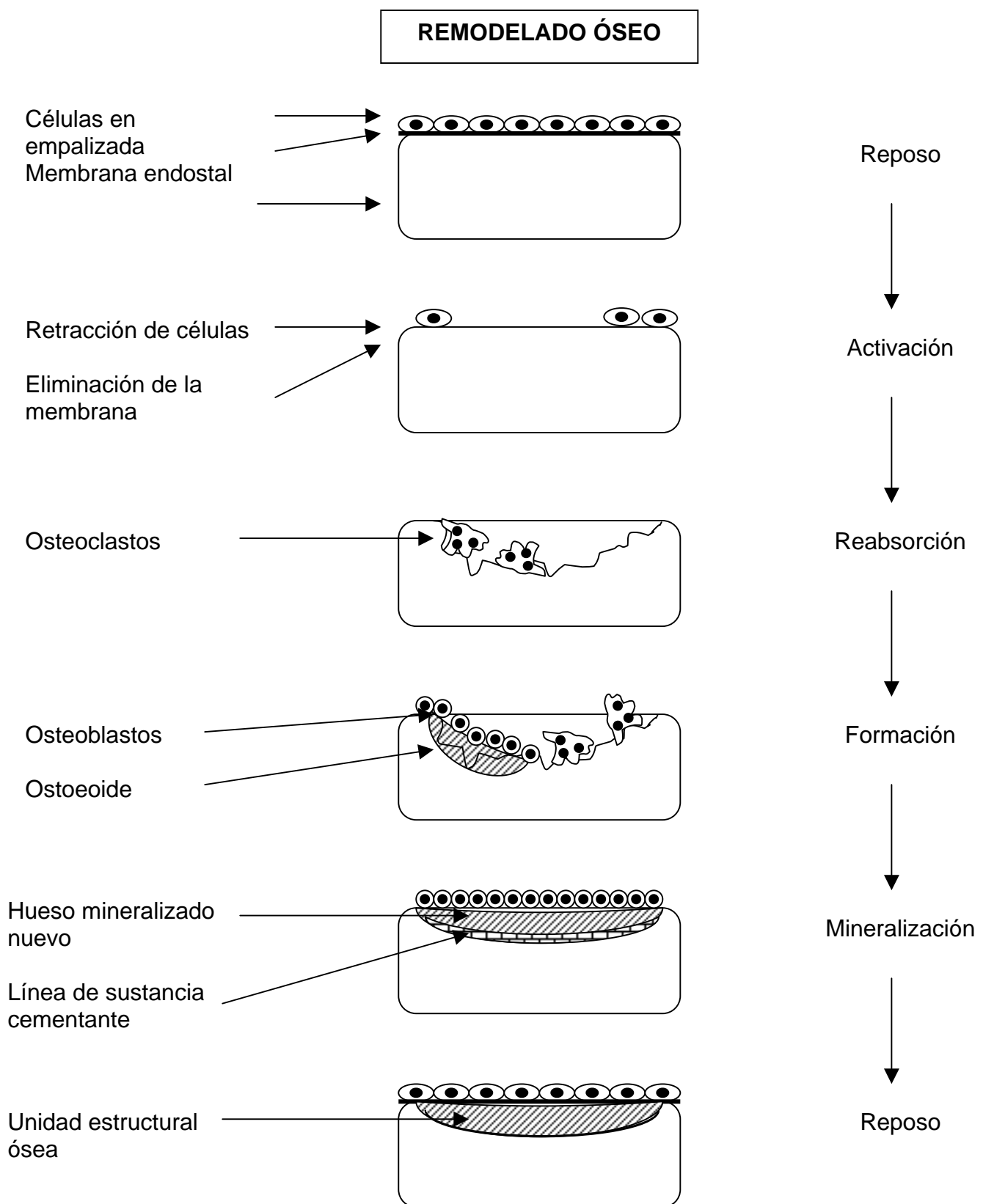


Figura 3. Representación esquemática del remodelado óseo (Modificado de Compston 2001)

El remodelado óseo se produce a lo largo de toda la vida, sin embargo el balance es positivo sólo hasta la tercera década, cuando se da el pico máximo de masa ósea y a partir de aquí, fluctúa ligeramente hasta los 50 años, donde claramente existe ya un predominio de la reabsorción y la masa ósea comienza a disminuir. Tanto la osteoporosis como la enfermedad periodontal constituyen sendos ejemplos de remodelado anormal (Mundy, 1991 y 1993 a).

A. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo

Desde un punto de vista clínico, es interesante conocer los marcadores bioquímicos del *turnover* óseo para valorar el proceso de remodelado. Por un lado, tenemos marcadores de formación ósea, como la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, el PICP (propéptido carboxi-terminal del procolágeno I) y el PINP (propéptido amino-terminal del procolágeno I) y por otro, marcadores de reabsorción, como la hidroxiprolina, ICTP (telopéptido carboxi-terminal del procolágeno I), INTP (telopéptido amino-terminal del procolágeno I) y la fosfatasa ácida resistente a tartrato, TRAP (Russell, 1997). (Tabla III).

Los osteoblastos sintetizan distintos marcadores de osteoformación en función de su estadio de diferenciación. Por ejemplo, durante la proliferación de precursores de osteoblastos comienza la producción de PICP (Lian y Stein, 1993). La fosfatasa alcalina se expresa tras terminar la proliferación celular y cesa cuando comienza la mineralización de la matriz, etapa esta última en la que se expresa la osteocalcina (Schonau y Rauch, 1997).

Tabla III. Marcadores óseos		
	FORMACIÓN	REABSORCIÓN
PLASMA	OSTEOCALCINA	FOSFATASA ACIDA
	PICP	ICTP
	PINP	
	FOSFATASA ALCALINA ÓSEA	
	RATIO CALCIO-CREATININA	
ORINA		HIDROXIPROLINA
		INTP
		CALCIO
		PIRIDINOLINA
		DEOXIPIRIDINOLINA

B. Factores reguladores del remodelado óseo

La regulación del remodelado óseo implica una compleja interconexión entre los factores genéticos, los estímulos mecánicos, los factores vasculares, nutricionales, las hormonas sistémicas, los factores de crecimiento y otros mediadores liberados localmente como las citoquinas (Fig. 4).

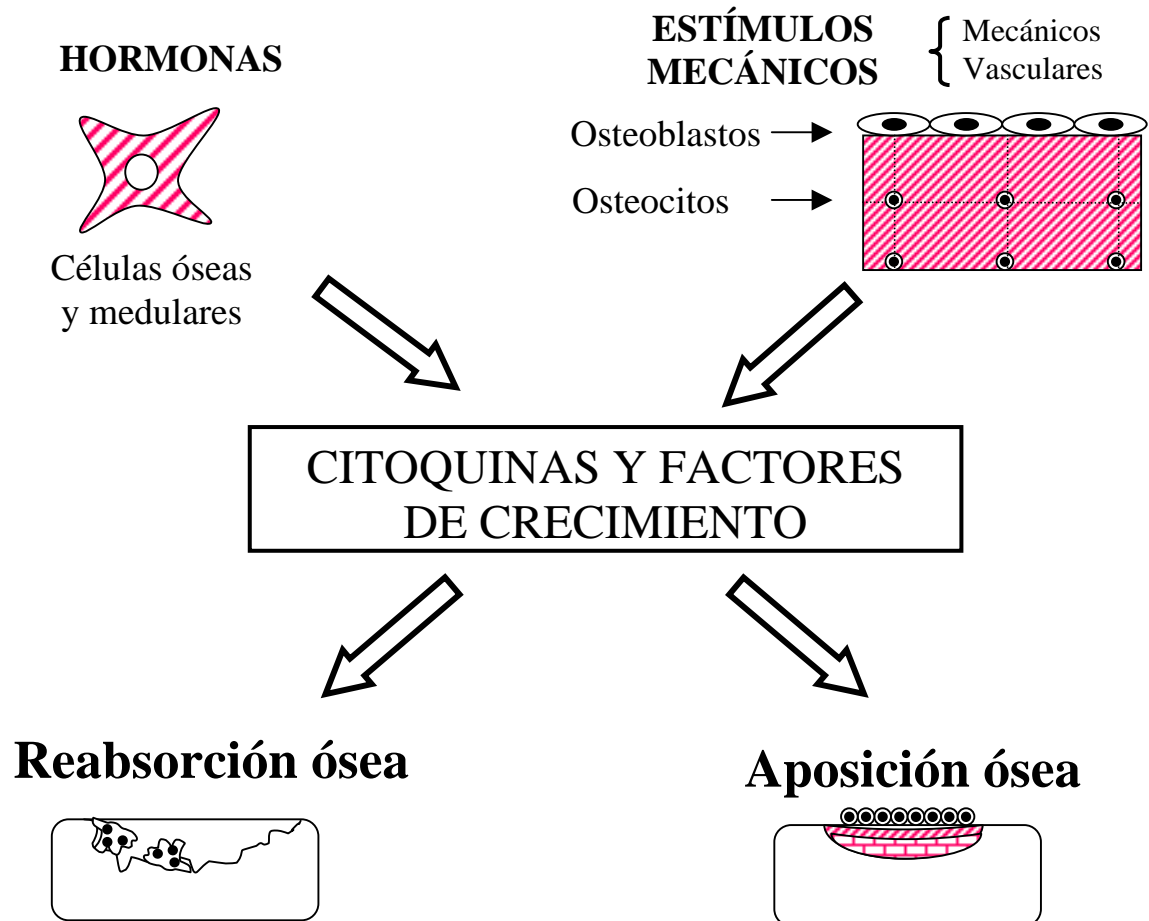


Figura 4: Control del remodelado óseo (Modificado de Compston 2001)

B.1. Factores genéticos

Son los que tienen mayor peso específico. Se sabe que la raza influye en la cantidad de masa ósea: las personas de raza negra tienen mayor masa ósea que las de raza blanca y éstas más que los de raza amarilla; parece ser que debido a la presencia de mayores niveles en suero de la hormona del crecimiento en la raza negra, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo (Wright *et al.*, 1995a, 2002). Por otro lado, se ha visto que existe mayor predisposición a padecer osteoporosis en hijas de madres que la padecen, por tanto, la masa ósea se “hereda” (Pocock *et al.*, 1987).

B.2. Factores mecánicos

Las fuerzas mecánicas son un factor determinante en el modelado y remodelado óseo y está ampliamente aceptado que los osteocitos son las células óseas más mecanosensoriales. La presencia de fuerzas de carga intermitente, dentro de los niveles fisiológicos, dan como resultado unos cambios metabólicos muy rápidos en estas células; una de las primeras manifestaciones es un aumento en la actividad de producción de la glucosa-6-fostatasa deshidrogenasa (Pead *et al.*, 1988). Hasta hoy, no ha sido establecido el mecanismo por el cual los osteocitos captan las cargas mecánicas, pero se cree que la deformación resultante tras la aplicación de fuerzas estimula el flujo del líquido intersticial a través de la red canalicular de los osteocitos (Piekarski y Munro 1977; Klein-Mulend *et al.*, 2005). Los cambios de potencial en la corriente electrocinética y/o los cambios en el fluido como consecuencia de tensiones y fuerzas de cizallamiento pueden modular la producción, por parte del osteocito, de mediadores tales como prostaglandinas (vía COX-2) (Li *et al.*, 2006) y óxido nítrico (Burger *et al.*, 1995; Nijweide *et al.*, 1996). Tanaka y colaboradores (2005) utilizando un modelo de cultivo de osteoblastos en una

matriz colágena en tres dimensiones han demostrado la expresión de los genes para c-fos, *egr1*, *cox2*, osteopontina y *mmp1B* en los osteoblastos sólo una hora después de aplicar tensión al modelo de estudio. Por tanto, estos mediadores pueden estimular la producción de otras citoquinas y factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento similar a la insulina IGF-I (Lean *et al.*, 1995), asociada a una reducción de la expresión de las integrinas (Bikle *et al.*, 2003). Varios trabajos muy recientes afirman que las vías de regulación del receptor estrogénico, del IGF-I, de las BMP y del Wnt (un tipo de factor de crecimiento), están implicadas en los mecanismos de mecanotransducción y que en parte, pueden contribuir a la buena o mala respuesta del hueso frente a la carga (Lau *et al.*, 2006; Pishvaian y Byers, 2007). La vía de señal del Wnt, sobre todo a través de la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR5) parece estar íntimamente relacionada con la regulación de la masa y fuerza óseas, ya que esta proteína transmembrana LPR5 es un mediador de la función de los osteoblastos maduros tras la carga (Sawakami *et al.*, 2006).

Al realizar ejercicio físico, la acción muscular transmite una tensión al hueso que es detectada por la red canalicular de osteocitos, incrementando tanto su actividad como la de los osteoblastos lo que conlleva una mayor formación ósea. Por el contrario, la ausencia de actividad muscular, el reposo o la falta de gravedad tienen un rápido efecto sobre el hueso, acelerando su reabsorción (Morey y Baylink, 1978; Ohira *et al.*, 2006), posiblemente por un bloqueo en las acciones de IGF-I (Bikle *et al.*, 1995). Según la Ley de Wolff: "el hueso responde en función de las fuerzas que se aplican sobre él"; por lo tanto si hay tensión habrá más formación ósea y si no hay tensión habrá más reabsorción. Bajos niveles de tensión mantenidos crónicamente conducirán a un modelo de «desuso» en el remodelado óseo. En dicho modelo se halla incrementado el *turnover* en todas las superficies óseas, pero en las superficies endostales, aquellas en contacto con la médula ósea, se reabsorbe

más hueso del que se forma. Este desbalance en el remodelado de la superficie endostal inducido por la inactividad es mediado por un factor liberado por la médula ósea, llamado Rho. Frost formuló la hipótesis de que el déficit de estrógenos altera el funcionamiento del mecanostato, disminuyendo la sensibilidad a las señales de tensión (Frost, 1992; 2004). Existe la evidencia de que «el mecanostato» lo componen, al menos en parte, los osteocitos que contienen receptores estrogénicos (Lanyon, 1993). Rho comprende una cascada de citoquinas derivadas de la médula ósea que incluye las citoquinas proinflamatorias y el sistema regulador OPG/RANKL/RANK. Estas citoquinas regulan la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos desde precursores celulares (Hofbauer *et al.*, 1999) y dichos precursores celulares en la médula ósea responden a estrógenos. Por tanto, es admisible que las citoquinas de la médula ósea medien los efectos de los estrógenos y de las tensiones biomecánicas. También se ha comprobado que el estímulo eléctrico activa la formación ósea (Yasuda, 1977).

B.3. Factores vasculonerviosos

Una adecuada vascularización es imprescindible para el desarrollo óseo normal, ya que de la sangre obtiene todo lo necesario para su formación y reparación (células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento). Se sabe desde los trabajos de Ham (1952) que las células óseas que están a más de 0'5 mm de un capilar sanguíneo, mueren por falta de nutrientes. De hecho, en las primeras etapas de la osificación y del proceso de reparación de fracturas se observa una irrupción de los vasos sanguíneos en el tejido cartilaginoso, que más tarde será sustituido por hueso.

El hueso también recibe sustancias procedentes de las fibras nerviosas, en concreto neuropéptidos como la Sustancia P, que participan en el desarrollo normal del

esqueleto. Quizá por esto cuando se produce la denervación del tejido óseo, se produce un retraso en la formación del callo de fractura y un aumento de la fragilidad.

B.4. Factores nutricionales

Es necesaria una cantidad mínima de calcio para que se pueda producir la mineralización y, sin embargo, un exceso no tiene ninguna repercusión en la masa ósea. Se estima que el mínimo necesario en la dieta es de 1.200 mg. al día hasta los 25 años y después y hasta los 45 no debe ser inferior a 1 g. diario. En mujeres menopáusicas, debe ser al menos de 1.500 mg. diarios de calcio.

Los hábitos tóxicos como el tabaco, la cafeína, el alcohol y el exceso de sal, suponen un factor de riesgo importante y potencialmente modificable, para la aparición de osteopenia (Hopper y Seeman, 1994).

B.5. Factores hormonales

Muchas hormonas sistémicas influyen sobre el modelado y remodelado óseos y el normal desarrollo del esqueleto está condicionado por la normalidad en el sistema endocrino. Además de los esteroides sexuales, es importante la hormona somatotropa (GH) y las hormonas calcitrópicas (PTH, calcitonina y calcitriol), así como los glucocorticoides. Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúan a distancia de su lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (efectos autocrino y paracrino), (Tabla IV).

Tabla IV. Factores hormonales (Modificado de Tresguerres, 1999)

FACTORES HORMONALES	EFFECTOS ÓSEOS
H. TIROIDEAS	<p>↑ MATRIZ OSTEOIDE (por los OB y ↑ IGF-I)</p> <p>↓ MATRIZ OSTEOIDE (↑ n° y función OC)</p>
PTH	↑ REABSORCIÓN
CALCITONINA	↓ REABSORCIÓN
	↑ MINERALIZACIÓN
1,25 (OH) ₂ D ₃	<p>↑ REABSORCIÓN</p> <p>(según el estado de diferenciación de los OC)</p>
INSULINA	↑ MATRIZ OSTEOIDE
GLUCOCORTICOIDES	↑ REABSORCIÓN
ANDRÓGENOS	↑ FORMACIÓN
ESTRÓGENOS	↑ FORMACIÓN
PROGESTERONA	↑ FORMACIÓN
GH	<p>↑ FORMACIÓN directamente y a través de</p> <p>IGF-I y II</p>

- *Hormonas tiroideas*: ejercen dos acciones contrapuestas sobre el hueso. Por un lado, actúan sobre los osteoblastos favoreciendo la síntesis y la mineralización de la matriz osteoide, estimulando la síntesis de IGF-I y por otro, estimulan directamente la reabsorción ósea, aumentando el número y función de osteoclastos e indirectamente a través de los osteoblastos. Esta es la razón por la que en el hipertiroidismo existe pérdida de masa ósea (Jódar Gimeno *et al.*, 1997).
- *PTH*: conocida como la hormona hipercalcemiente por excelencia, ya que favorece la reabsorción, sin embargo a finales de los años ochenta se descubrió su papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β (Canalis *et al.*, 1989). Los últimos trabajos indican la implicación del gen inducido anabólicamente por PTH en el hueso en la acción anabólica de esta hormona (Robinson *et al.*, 2006).
- *Calcitonina*: se sabe que inhibe la reabsorción obstaculizando la proliferación y la actividad de los osteoclastos, si bien parece tener un efecto muy leve.
- *1,25(OH)₂ vitamina D₃*: en el organismo en general, interviene favoreciendo la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización. Se necesita para el crecimiento normal. En el hueso en particular los efectos son de tipo bifásico, según el estado de diferenciación de los osteoblastos (Lian y Stein, 1993), por un lado parece regular localmente la diferenciación de los osteoclastos (Mundy, 1991) y por otro puede favorecer la reabsorción ósea (Raisz, 1993).
- *Insulina*: estimula directamente la síntesis de matriz ósea e indirectamente, al favorecer el incremento de la síntesis de IGF-I hepática.
- *Glucocorticoides*: disminuyen la formación ósea y aumentan la reabsorción, quizá actuando directamente o indirectamente alterando la absorción intestinal de calcio (Raisz, 1993). En los osteoblastos inhibe la síntesis de IGF-I, aunque en la década pasada se observó que *in vitro* estimulaban la diferenciación de estas células (Lian y Stein, 1993).

- *Andrógenos*: su efecto es anabolizante sobre el hueso. Siempre se dijo que producían el pico de GH de la pubertad, pero hoy se sabe que esta acción está producida por los estrógenos (Compston, 2001).
- *Estrógenos*: incrementan el número y la función de los osteoblastos, favoreciendo la formación del hueso (Chow *et al.*, 1992a y 1992b) y disminuyendo la reabsorción (Compston, 2001).
- *Progesterona*: también tiene un efecto anabolizante sobre el hueso, directamente a través de los osteoblastos e indirectamente mediante la competición por los receptores osteoblásticos de glucocorticoides (Compston, 2001).
- *Hormona de crecimiento*: estimula la actividad de los osteoblastos, generando un aumento en la síntesis de colágeno I, osteocalcina y fosfatasa alcalina (Kassem *et al.*, 1993). También actúa indirectamente al favorecer la síntesis de IGF-I y II por los propios osteoblastos y de IGF-I por el hígado, sustancias que a su vez estimulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

B.6. Factores locales

El hueso es una fuente muy rica de citoquinas y factores de crecimiento (Fig. 5, Tabla V), así como de otros mediadores como prostaglandinas y óxido nítrico. Además, las células del microambiente óseo juegan un papel decisivo en la regulación del remodelado óseo, tanto como fuente de precursores de células óseas, como mediante la producción de citoquinas activas óseas y factores de crecimiento.

Tabla V. Citoquinas y factores de crecimiento que afectan al hueso (Modificado de Tresguerres, 1999)
Estimuladores de la reabsorción ósea
Interleuquinas -1, -6, -8, -11
Factores de necrosis tumoral
Factor de crecimiento epidérmico
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
Factor de crecimiento fibroblástico
Factor inhibidor de la leucemia
Factor estimulante de colonias de macrófagos
Factor estimulante de colonias de macrófagos/granulocitos
Inhibidores de la reabsorción ósea
Interferón
Interleuquina - 4
Estimuladores de la formación ósea
Factores semejantes a la insulina
Factor de crecimiento transformante - β
Factores de crecimiento fibroblástico
Proteínas morfogenéticas óseas

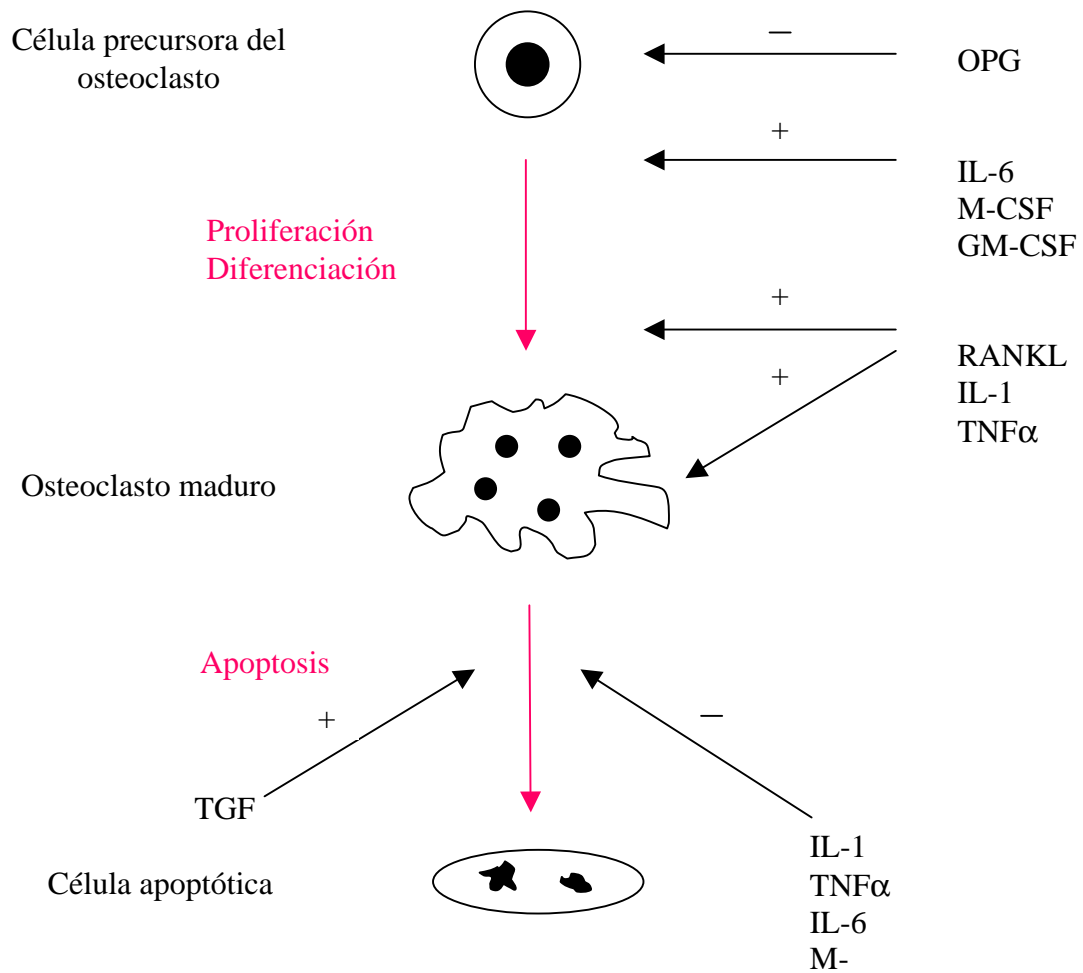


Figura 5. Efectos de las citoquinas sobre los osteoclastos. (Modificado de Compston 2001)

- *Factores de crecimiento:* Son polipéptidos que actúan modulando las funciones celulares (crecimiento y diferenciación) y que son sintetizados por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, (Serrano y Casas, 1997). En el hueso actúan los siguientes:

* *IGF-I y II:* Los IGFs existen en dos formas: IGF-I e IGF-II, siendo éste último el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, pero sus efectos son menores que los del IGF-I (Mohan y Baylink, 1991). En la circulación, forman una estructura compleja de gran peso molecular con proteínas de unión (IGFBPs) y, en el caso de los complejos IGFBP -3 y -5, una subunidad ácido-lábil (Rechler 1993). Los IGFs estimulan la formación ósea y su producción es regulada por células óseas mediante una serie de hormonas sistémicas y factores producidos localmente (hormonas como GH, estrógenos y progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben) (Canalis *et al.*, 1991; Canalis 1996). Incrementan la proliferación de los precursores de osteoblastos y estimulan la síntesis e inhiben la degradación del colágeno tipo I. Los osteoblastos poseen receptores para ellos, sobre los que ejercen una acción mitogénica y diferenciadora (Canalis, 1980; Hock *et al.*, 1988; McCarthy *et al.*, 1989). Asimismo, favorecen la activación de los osteoclastos, mediando en la interacción osteoblasto-osteoclasto e interviniendo de forma activa en el remodelado óseo (Hill *et al.*, 1995). Existen al menos seis IGFBPs (Canalis *et al.*, 1991; Canalis 1996; Lamson *et al.*, 1991) y todas ellas se expresan en las células óseas en varios sistemas *in vitro* (Rosen 1999). Todas las IGFBPs se unen a los IGFs con gran afinidad evitando su interacción con el receptor. Sin embargo, debido a las modificaciones post-translacionales que desembocan en los cambios en las estructuras así como en las funciones, las IGFBPs pueden provocar efectos tanto

inhibidores como estimuladores; esto es, por ejemplo, las IGFBP-1 y -3 poseen un potencial ora estimulador ora inhibidor, las IGFBP-2 y -4 son inhibidoras y la IGFBP-5 es estimulante (Mohan *et al.*, 1995). La IGFBP-6 tiene actividad inhibidora y muestra una afinidad selectiva por IGF- II frente a IGF-I. La complejidad del eje IGF se ve aumentada por la acción de las IGFBP proteasas, que afectan a la capacidad de unión de las IGFBP y que pueden estar reguladas por el propio IGF (Conover 1996; Durham *et al.*, 1994).

* *TGF- β* : La superfamilia de los TGF- β incluye las isoformas TGF- β , activinas e inhibinas y las BMPs (Bonewald 1996). El TGF- β está presente en la matriz ósea (es producido en el propio hueso) en una forma latente, inerte biológicamente y su forma activa se libera en los procesos de reabsorción ósea. (Pfeilschifter y Mundy 1987). Es un potente estimulador de la formación ósea (Noda y Camilliere 1989), incrementando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de proteínas de matriz ósea y sus receptores, mientras que inhibe la síntesis de proteasas así como la actividad de los osteoclastos maduros. Dependiendo de su concentración y de otros factores, puede inhibir la proliferación osteoblástica y promover la reabsorción (Lian y Stein, 1993. Baylink *et al.*, 1993). Existen muchos datos que apoyan los efectos inhibitorios sobre la reabsorción ósea de los osteoblastos (De Souza *et al.*, 1997; Marcelli *et al.*, 1990) debido tanto a los efectos sobre la formación como sobre la actividad de los osteoclastos, esto último mediante la estimulación de la apoptosis osteoclástica (Hughes *et al.*, 1996). Además, inhibe la proliferación epitelial y media en el efecto anabolizante de los andrógenos y en la reabsorción de la PTH y glucocorticoides. Existen tres tipos principales de receptores para TGF β (Cheifetz *et al.*, 1986): los tipos I y II, que son kinasas serina / threamina transmembrana y que funcionan como receptores de

señal (Franzen *et al.*, 1993) y el tipo III, betagliano, que no es de señal (Wang *et al.*, 1991). Se cree que el TGF- β se une directamente al receptor tipo II, que está constitutivamente activo y que posteriormente, este complejo es reconocido por el receptor tipo I, que se fosforila por la acción del receptor tipo II (Wrana *et al.*, 1994).

* *PDGF*: El mayor interés en cuanto a acciones del PDGF se ha centrado en su papel como agente cicatrizante de heridas, dado que sería liberado tras la agregación y degranulación plaquetaria en el sitio de la lesión. Esto provoca una marcada proliferación de los fibroblastos, los cuales tienen una gran sensibilidad al PDGF, y un aumento de la síntesis de colágeno (Dieguez *et al.*, 1992; Nash *et al.*, 1994). En el hueso estimula la síntesis proteica por los osteoblastos, pero también la reabsorción ósea (Centrella *et al.*, 1989), si bien, su papel fisiológico más importante parece ser la replicación celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ello se ha postulado que podría intervenir en la reparación de las fracturas (Prieto, 1992).

* *FGF*: Es el Factor Fibroblástico de Crecimiento y es anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y de las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos del ligamento periodontal (Canalis *et al.*, 1988). Se conocen dos FGF: ácido y básico con notable semejanza estructural entre ellos. Ambos tienen actividad mitógena sobre las células endoteliales vasculares y sobre células de estirpe osteoblástica y favorecen la síntesis de las matrices extracelulares cartilaginosa y ósea. Por su capacidad de estimular la replicación celular y la formación de vasos nuevos, se les atribuye una acción reparadora en heridas y fracturas (Prieto, 1992).

* *VEGF*: Es el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular. Se han llevado a cabo diversos estudios con VEGF para estudiar su efecto sobre la osteogénesis. En un estudio llevado a cabo por Miyanishi y colaboradores (2003) sobre la osteolisis producida por prótesis de titanio fracasadas encontraron un aumento de liberación de VEGF por parte de monocitos / macrófagos en respuesta a los desechos de desgaste de los biomateriales ortopédicos, y concluyeron que este aumento podía contribuir a la osteolisis periprotética y a la pérdida de los implantes ortopédicos. Estos hallazgos se complementan con los encontrados por Eckardt y colaboradores (2003) que estudiaron la angiogénesis terapéutica en un modelo experimental animal de distracción ósea, utilizando una bomba de liberación mini-osmótica de VEGF humano, inhibidor de VEGF y placebo en el defecto de la osteotomía; no encontraron diferencias significativas entre los tres grupos por lo que desaconsejaron la utilización de VEGF para favorecer la formación ósea en este tipo de terapia.

* *EGF*: El Factor de Crecimiento Epidérmico tiene una gran homología con otro factor de crecimiento: el TGF- α , de hecho, ambos polipéptidos ejercen sus acciones a través del mismo receptor y sus efectos biológicos son, al menos cualitativamente, similares. Es sintetizado en un gran número de tejidos del organismo (la mayor producción tiene lugar a nivel de la glándula submaxilar, principalmente del macho) y está presente en diversos fluidos biológicos. Es un potente mitógeno de células y tejidos ectodérmicos y mesodérmicos, tales como células de la musculatura lisa vascular, fibroblastos, etc. Durante el período de desarrollo fetal y neonatal se ha observado que el EGF incrementa el transporte de calcio y el número de receptores de la vitamina D, entre otras muchas acciones (Dieguez *et al.*, 1992).

- * *BMPs*: pertenecen a la superfamilia de los TGF- β . Poseen propiedades osteoinductivas, estimulando la diferenciación de las células precursoras de los osteoblastos y condroblastos y tienen la característica de que pueden iniciar *de novo* la síntesis de hueso y cartílago, a través de la diferenciación de células pluripotenciales. Son similares aunque no idénticas en cuanto a estructura y actividad a los TGF- β (Wozney *et al.*, 1988). Las BMPs actúan como morfogenes durante la embriogénesis, con el patrón de producción de BMPs -2, -4 y -6 que indican su implicación en la formación de cartílago y hueso. Todavía no se han descubierto los mecanismos de regulación y las funciones precisas de las BMPs. Se ha demostrado la estimulación inducida por estrógenos en la producción de mRNA y proteína de BMP-6, en las líneas celulares de osteoblastos humanos (Rikard *et al.*, 1998). Son abundantes en hueso y favorecen la actividad osteoblástica (Reddi y Cunninham, 1993).
- *Citoquinas*: Estos polipéptidos se sintetizan en linfocitos y monocitos. Tienen efecto autocrino, paracrino y endocrino e intervienen en la respuesta inmune, en los procesos inflamatorios y en la hematopoyesis. A nivel óseo, encontramos:

⇒ *Interleuquina 1*: Actúa directamente sobre la reabsorción osteoclástica, si bien no tiene efecto sobre los osteoclastos maduros (Tatakis, 1993). Se trata de tres moléculas relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y Antagonista del receptor de IL-1, que como su nombre indica, es inhibidora del efecto de las otras dos (Mundy, 1993 a y b). Las interleuquinas 1 α y 1 β son unos potentes estimuladores de la reabsorción ósea, *in vivo* e *in vitro* (Boyce *et al.*, 1989; Gowen *et al.*, 1983; Sabatini *et al.*, 1988). Estos efectos tienen lugar tanto por un incremento en la proliferación y diferenciación de los precursores de los osteoclastos, como mediante el aumento de

la actividad osteoclástica (Pfelschifter *et al.*, 1989; Thomson *et al.*, 1986) esto último como resultado, al menos en parte, de los efectos inhibidores sobre la apoptosis de los osteoclastos. Algunos de los efectos de la IL-1 sobre los osteoclastos son consecuencia de un aumento en la síntesis de PGE (Boyce *et al.*, 1989). La IL-1 también tiene efectos sobre los osteoblastos que dependen, probablemente, de si la administración se produce de forma continua o discontinua (Gowen *et al.*, 1985 a y b; Smith *et al.*, 1987). En el primer caso, al administrar de forma continua, se producen efectos inhibidores sobre la formación de hueso, mientras que la administración intermitente se asocia con un aumento en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) es un inhibidor de IL-1 que se da de forma constitutiva (Hannum *et al.*, 1990) y actúa bloqueando la estimulación de la reabsorción ósea inducida por IL-1 tanto *in vitro* (Seckinger *et al.*, 1990) como *in vivo* (Guise *et al.*, 1993).

⇒ *Interleuquina 6*: también favorece la reabsorción ósea, aunque mediante mecanismos diferentes y se ha implicado en la patogenia de la enfermedad de Paget (Roodman *et al.*, 1992). Su producción en hueso aumenta gracias a otras citoquinas favorecedoras de la reabsorción ósea y a hormonas sistémicas (se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25(OH)2D3) (Feyen *et al.*, 1989), también trabaja de forma sinérgica con estos agentes, incrementando sus efectos sobre la reabsorción (De la Mata *et al.*, 1995). *In vivo*, los efectos de la IL-6 pueden estar regulados por los niveles circulantes del receptor soluble de IL-6 (Tamura *et al.*, 1993). Parece tener un papel importante en las primeras etapas de la osteoclastogénesis (Jilka *et al.*, 1992).

⇒ *Interleuquina 2*: se sintetiza en la médula ósea y estimula la formación osteoclástica (Girasole *et al.*, 1994).

⇒ *Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF)*: actúa en las primeras etapas del desarrollo de las células precursoras hematopoyéticas, incluyendo los osteoclastos (Kurihara *et al.*, 1990). Al contrario que M-CSF, no es primordial para la osteoclastogénesis, aunque ayuda a la diferenciación de los precursores de los osteoclastos. Se ha publicado que el GM-CSF aumenta la proliferación de células osteoblásticas *in vitro* (Dedhar *et al.*, 1988) e *in vivo* (Thacker *et al.*, 1994), probablemente mediante un mecanismo de acción indirecto. Puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (Mundy, 1993 a. Edwards *et al.*, 1998).

⇒ *Prostaglandinas*: Los estudios *in vitro* indican que, sobre todo la PGE₂, pero también las PGE₁, PGG₂ PGI₂ y PGH₂ estimulan la reabsorción ósea, gracias al incremento de la síntesis de AMP-c (Kawaguchi *et al.*, 1995). Se ha demostrado su papel en la destrucción ósea que acontece en la enfermedad periodontal midiendo, *in vivo*, los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular (Offenbacher *et al.*, 1993). Asimismo, cuando se utilizan inhibidores de las prostaglandinas (ibuprofeno o flurbiprofeno) se observa una disminución de la pérdida ósea de causa periodontal (Williams *et al.*, 1985 y 1988) o periimplantaria (Weber *et al.*, 1994. Jeffcoat *et al.*, 1995).

⇒ *TNF*: *In vitro* favorece el proceso resorptivo y parece estar implicado en la pérdida ósea que se produce en la artritis y en la enfermedad periodontal. El TNF α y la linfotoxina (TNF β) son potentes estimuladores de la reabsorción ósea (Bertolini *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1989), y parece ser que actúan del mismo modo que la IL-1. Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas ya que la indometacina inhibe parcialmente la reabsorción (Jadinski, 1988).

3.1.2.3. *El proceso biológico de la osteointegración*

El lecho labrado en el hueso para la colocación de las fijaciones de titanio no es sino una herida o solución de continuidad en el tejido óseo y su reparación es similar a la que se produce en la reparación de fracturas. Este proceso es una compleja cascada de acontecimientos, donde están implicados células, vasos y matriz ósea. Lo primero que se forma en el hueso tras sufrir el trauma es un hematoma (Bostrom *et al.*, 1995), con hematíes, plaquetas y fibrina, que favorece la llegada de linfocitos, macrófagos y células mesenquimales pluripotenciales. Para que se pueda formar a un nuevo tejido fibrovascular, sustituyendo al coágulo, se liberan localmente citoquinas, hormonas y factores de crecimiento (fundamentalmente TGF- β , BMP y PDGF) que interaccionan entre sí y que favorecen la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. En los huesos largos se forma un callo de fractura primero cartilaginoso (donde intervienen condroblastos), que luego se irá sustituyendo por hueso (acción osteoblástica); en los huesos cortos y planos, de osificación membranosa, los osteoblastos del periostio adyacente a la fractura forman directamente el callo óseo. Es fundamental la presencia de vasos en el tejido en formación que nutra adecuadamente todo el proceso, así como la síntesis de proteínas para poder formar las nuevas estructuras. En último lugar, acontecerá la mineralización de la matriz osteoide.

3.2. OSTEOPOROSIS

3.2.1. DEFINICIÓN

La osteoporosis es una enfermedad sistémica esquelética caracterizada por una masa ósea disminuida para la edad y sexo del individuo, con alteración de la microarquitectura de los huesos y con una disminución del grosor de la cortical, lo que confiere un aumento de la fragilidad ósea y una mayor facilidad para la aparición de fracturas; la osificación es normal pero hay una matriz inadecuada para osificar (Osorio y *et al.*, 2003). Microestructuralmente esto se traduce en un adelgazamiento de las laminillas óseas, tanto a nivel trabecular-epifisario (esqueleto axial), como cortical-diafisario (metáfisis del radio, cuello del fémur y húmero) (Reche y *et al.*, 2003). De esta forma se alteran las dos características principales de la resistencia ósea: la densidad y la calidad ósea (Fig. 6).

La densidad ósea se expresa en gramos de mineral por superficie o volumen y en un individuo dado, se determina por el “pico” de masa ósea y la cantidad de pérdida ósea. La calidad del hueso se refiere a la arquitectura, recambio, acumulación de daño (microfracturas) y la mineralización. La masa ósea es la cantidad total de hueso de la que dispone un individuo y alcanza su máximo entre los 30-35 años. Entre otros métodos diagnósticos, el más eficaz, a la hora de cuantificarla, es la densitometría (Miller *et al.*, 1999).

Un concepto importante es que la osteoporosis es un trastorno que produce una disminución de la densidad de matriz ósea normalmente mineralizada, y la osteomalacia es un trastorno en el que se conserva la masa total de hueso, pero con un déficit importante de su mineralización (Faibish *et al.*, 2005).



Figura. 6. Radiografía de columna vertebral osteoporótica (material de autopsia) en la que se observa una pérdida de masa ósea con preservación de las trabéculas vertebrales, nódulo de Schmorl y aplastamiento vertebral. (Cortesía Dr. F. López Barea *en* Osorio *et al.*, 2003).

El desarrollo en tamaño y fuerza óseos se produce durante la infancia, pero no se completa hasta la tercera década de la vida, después de haber terminado el crecimiento longitudinal. La masa ósea alcanzada en las primeras etapas de la vida, es quizá el mayor determinante de la salud esquelética. Los individuos con mayor “pico” de masa ósea después de este momento tienen la mayor ventaja protectora frente a las agresiones a esa densidad ósea que, inevitablemente, suponen la edad, la enfermedad y la disminución de la producción de los esteroides sexuales. Los factores genéticos juegan un papel importante en ese máximo posible de masa ósea, en el que también colaboran la nutrición, el peso corporal, la exposición a hormonas sexuales en la pubertad y la actividad física (Rizzoli y Bonjour, 2004).

3.2.2. CLASIFICACIÓN

Se han descrito varias clasificaciones de la osteoporosis atendiendo a distintos criterios.

En 1994, un Comité de Expertos de la OMS (WHO, 1994), de forma consensuada, definió la osteoporosis según criterios densitométricos, esto es, en función de la densidad de masa ósea perdida respecto a los valores medios de una población homogénea (mismo sexo, misma raza y edad comprendida entre 20-40 años). A la densidad de masa ósea de esta población se denominó “*T*”. Surgieron cuatro grupos bien definidos (Tabla VI):

Tabla VI. Clasificación de la osteoporosis (WHO, 1994)

- NORMAL: $DMO \geq 1DE$ t-score
- OSTEOPENIA: DMO entre $-1 DE$ y $-2,5$ t-score
- OSTEOPOROSIS: $DMO \leq 2,5 DE$ t-score
- OSTEOPOROSIS ESTABLECIDA: $DMO \leq 2,5 DE$ + fractura por fragilidad.

t-score = valor que compara la DMO con respecto a la media de la población adulta joven del mismo sexo ($DMO \text{ paciente} - DMO \text{ adulto joven del mismo sexo} / DE \text{ de la DMO del adulto joven del mismo sexo}$).

DE= desviación estándar de la media.

Esta clasificación permitió homogeneizar poblaciones, así como establecer un criterio diagnóstico de osteoporosis. De igual manera se inició la profilaxis con tratamientos médicos diversos para prevenir la aparición de las fracturas (Reche y *et al.*, 2003).

En la tabla VII (Tabla VII) se muestran los principales tipos de osteoporosis generalizadas o sistémicas (Romanillos y Rodríguez, 2003).

3.2.3. EPIDEMIOLOGÍA

Es difícil de establecer la prevalencia de la enfermedad y depende en gran medida del concepto de osteoporosis al que nos estemos refiriendo. Considerando de forma estricta el concepto densitométrico (osteoporosis más osteopenia), es posible que se aproxime al 80% en el caso de las mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, esta cifra es mucho menor si consideramos solamente las personas con fracturas (Reche y *et al.*, 2003).

Tabla VII. Tipos de osteoporosis (Romanillos y Rodríguez, 2003)

PRIMARIA

Osteoporosis juvenil idiopática

Osteoporosis idiopática en adultos

Osteoporosis involutiva (postmenopáusica)

SECUNDARIA

Hipercortisolismo (Sd. Cushing)

Alcoholismo crónico

Hiperparatiroidismo

Hipertiroidismo

Diabetes mellitus tipo 1

Enfermedades reumáticas (artritis reumatoide)

Inmovilización, encamamiento

Neoplasias (mieloma múltiple)

Trastornos digestivos (gastrectomía, síndromes de malabsorción...)

Aunque es cuatro veces más frecuente en las mujeres, los hombres también sufren de osteoporosis. Se estima que hay aproximadamente 400 millones de mujeres en el mundo que están incapacitadas de alguna manera a consecuencia de la osteoporosis postmenopáusica (Kong y Penninger, 2000). Existen estudios que sitúan a España en una tasa de incidencia de fracturas de cadera de 130/100.000 habitantes (Rodríguez y *et al.*, 1994).

En nuestro país, el coste del tratamiento de las fracturas de origen osteoporótico en los servicios hospitalarios supera los 800 millones de euros y menos del 35 % de los pacientes recupera una capacidad funcional similar a la previa (Sociedad Española de Geriatría y Gerodontología, 2005).

La incidencia aumenta con la edad de forma geométrica (cada década a partir de los 40 años supone un aumento del riesgo de padecer osteoporosis de 1,4-1,8 veces). Por tanto, está previsto que la incidencia de esta enfermedad se incremente en las próximas décadas a medida que la esperanza de vida aumente (epidemia silenciosa). La raza blanca y la oriental padecen más la enfermedad que la negra africana. Se sospecha que este dato está en relación con el pico de masa ósea (Reche y *et al.*, 2003).

El pico máximo de masa ósea viene determinado por factores exógenos (controlables), como son el tipo de dieta (calcio-vitamina D), el ejercicio físico, el tabaco, el alcohol, determinados fármacos, y por factores endógenos (no controlables por el momento) determinados genéticamente. Se alcanza alrededor de los 35 años y cuanto mayor sea la reserva ósea, más lenta será la pérdida de masa ósea, tanto en la mujer como en el hombre y más tarde aparecerá la enfermedad. La Tabla VIII resume los principales factores de riesgo de la osteoporosis (Reche y *et al.*, 2003).

Tabla VIII	
Factores de riesgo de la osteoporosis	
•	Edad avanzada
•	Sexo femenino
•	Historia familiar de osteoporosis
•	Menopausia precoz
•	Vida sedentaria
•	Dieta
•	Fármacos
•	Tabaco, alcohol, café
•	Bajo índice de masa corporal

La osteoporosis idiopática es, con mucho, la más frecuente de todas. La causa habitual de la **osteoporosis tipo I** es la menopausia (aunque no es la única, puesto que también afecta a varones) y la edad de presentación son los 65-70 años, con una proporción de mujer a hombre de 6:1. Las fracturas del extremo distal del radio afectan típicamente a mujeres entre los 65 y los 70 años. Constituyen un marcador de osteoporosis y de riesgo de fractura de cadera (importante desde el punto de vista de profilaxis médica).

En la osteoporosis tipo II, involutiva o senil, las fracturas de cadera y del extremo proximal de húmero son el indicador epidemiológico más fiable de la prevalencia de osteoporosis, puesto que, habitualmente requieren hospitalización.

3.2.4. ETIOPATOGENIA

Como parte del proceso natural de la edad, los huesos comienzan a descomponerse más rápido de lo que las células pueden formar nuevo tejido óseo. En las mujeres, la pérdida ósea se acelera tras la menopausia cuando los ovarios cesan de producir estrógenos, una de las hormonas que protege frente a esta pérdida.

Dentro del proceso de pérdida ósea existen dos mecanismos primarios:

- Pérdida rápida: asociada a destrucción osteoclástica, presentando perforaciones de las trabéculas.
- Pérdida lenta o crónica.

A nivel celular y tisular, existen dos mecanismos de pérdida ósea en la osteoporosis. (Compston 1999) (Fig. 7). Cuantitativamente, lo más importante es un aumento en la frecuencia de activación (también conocida como *turnover* óseo elevado) en el que aparecen mayor número de *BMUs* activadas sobre la superficie ósea; esto significa que en cualquier momento hay mayor número de unidades llevando a cabo reabsorción ósea, que es potencialmente reversible siempre y cuando vaya emparejado con el remodelado óseo y ese balance se mantenga. El segundo mecanismo, que normalmente coexiste con el *turnover* óseo elevado, es el del remodelado desequilibrado, o de balance negativo, en el que la cantidad de hueso formada por las unidades remodeladoras individuales es menor que la reabsorbida, debido tanto a un aumento en la reabsorción como a una disminución en la formación ósea, o a una combinación de ambos procesos. Este tipo de pérdida ósea es irreversible una vez que el ciclo de remodelado se ha completado, al menos en lo que a esa unidad remodeladora se refiere.

Las alteraciones en el remodelado responsable de la pérdida de hueso se acompañan de cambios en la arquitectura ósea, que es un factor muy importante en la resistencia mecánica del hueso (Compston *et al.*, 1990). En el hueso esponjoso se puede producir tanto un adelgazamiento de las trabéculas óseas, como la perforación y/o erosión de las mismas. En cierto modo, estas dos situaciones dependen una de la otra. Cuando se da adelgazamiento trabecular, la arquitectura ósea está mejor conservada que cuando aparecen perforaciones y/o erosiones, presentando estos últimos procesos los efectos más adversos

sobre la resistencia ósea. Un aumento en la frecuencia de activación y/o en la profundidad de reabsorción predisponen a la aparición de perforaciones y erosiones, mientras que los estados de bajo *turnover* óseo favorecen el adelgazamiento trabecular.

Parece ser que la expresión del OPG (factor inhibidor de la osteoclastogénesis) está inducida por los estrógenos (17- β –estradiol) (Hofbauer et al., 1999; Kong y Penninger, 2000), lo que aporta una posible explicación a la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Por eso, el declive de las hormonas sexuales en la menopausia altera los reguladores naturales de la masa ósea y lo que se produce es la pérdida de tejido óseo, con todas las consecuencias que este hecho conlleva, como fragilidad ósea, artritis o fracturas de cadera. A nivel molecular, la disminución de la función ovárica lleva a la caída de los niveles de estrógenos y por tanto, al descenso de los niveles de OPG. En un estudio llevado a cabo en ratas ovariectomizadas se vio que la inyección de OPG bloqueaba la pérdida ósea y la osteoporosis que normalmente aparece asociada a la pérdida de función ovárica (Simonet et al., 1997).

3.2.5. CLÍNICA

El fenómeno clínico fundamental en la osteoporosis es la fractura, que se caracteriza por tener una estrecha relación con la edad, afectar sobre todo a las mujeres postmenopáusicas, ser precedidas por traumatismos de baja energía y producirse en huesos debilitados, patológicos y con baja densidad de masa ósea.

En la osteoporosis tipo I la manifestación clínica típica es el aplastamiento vertebral. La fractura suele ser secundaria a una caída y cursa con dolor a punta de dedo sobre la línea media dorsal e irradiación metamérica según la altura. Existe contractura de la musculatura paravertebral y a veces se puede sumar al cuadro de dolor un íleo paralítico por mecanismo reflejo.

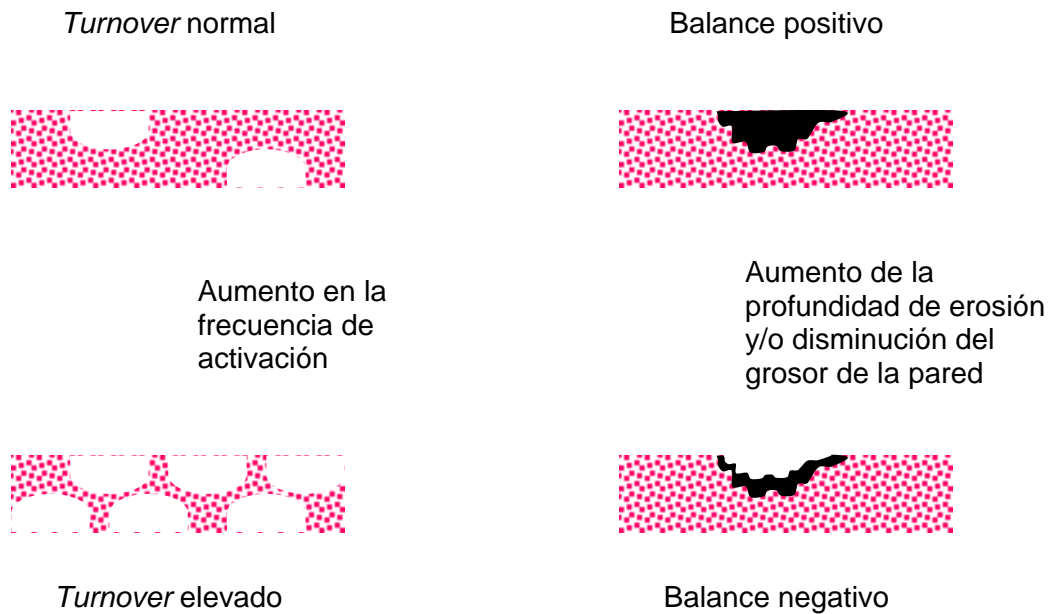


Figura 7: Mecanismo de la pérdida ósea en la osteoporosis (Modificado de Compston JE, 2001)

Las fracturas del extremo distal del radio van precedidas de una caída sobre el talón de la mano, posterior dolor, deformidad en “dorso de tenedor”, tumefacción e impotencia funcional.

En la osteoporosis tipo II, involutiva o senil, son típicas las fracturas de cadera y del extremo proximal del húmero. La fractura de cadera se caracteriza por dolor, en muchas ocasiones irradiado a la rodilla, claudicación en la marcha, acortamiento y rotación externa del miembro afecto. Las fracturas subcapitales de húmero, que se producen tras sufrir una caída con traumatismo indirecto sobre el brazo, cursan con dolor, deformidad, tumefacción e impotencia funcional.

3.2.6. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de esta enfermedad son necesarias técnicas que de una manera directa o indirecta valoren las características óseas. A lo largo de la historia se han utilizado diversas técnicas de imagen, desde isótopos pasando por RX, ultrasonidos, TAC e incluso estudios anatomopatológicos, con la finalidad de obtener una medición más precisa de la densidad y la arquitectura óseas, que ayuden a identificar a aquellos grupos con mayor riesgo de fractura (tabla IX) (Cobo y *et al.*, 2003).

Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, la forma de diagnosticar la osteoporosis es clínica, cuando el enfermo va a urgencias tras sufrir un traumatismo casual y es diagnosticado de fractura. Otras veces se diagnostica en la consulta por el aumento de la cifosis dorsal y disminución de la talla.

3.2.6.1. *Medición de la densidad mineral ósea*

A. El estudio **radiológico convencional**, en ausencia de fractura, es poco útil para apreciar cambios de la densidad ósea precoces. De hecho, hace falta una pérdida de al menos un 30% para que sea apreciable. Sin embargo, cuando se ha producido la fractura, es extremadamente útil. Además, se utiliza para el diagnóstico diferencial de las fracturas patológicas, para descartar la posibilidad de que se trate de un tumor óseo o secundario a metástasis (Cobo y *et al.*, 2003).

B. En la actualidad, los criterios diagnósticos de la osteoporosis se basan en la densitometría radiológica de doble energía axial **DXA, QDR o DEXA** (es la que se suele utilizar en el Sistema Nacional de Salud) en lumbar y femoral. Como ya se ha comentado anteriormente, la OMS estableció por consenso los criterios diagnósticos de la enfermedad teniendo en cuenta preferiblemente la DEXA, evaluando la DMO o el CMO en lumbar, femoral y radio de la mujer (Tabla VI) (Cobo y *et al.*, 2003).

Tabla IX

Técnicas para la valoración de la osteoporosis (Cobo y *et al*, 2003)

1. Técnicas de medición de la densidad mineral ósea.

a. Técnicas radiográficas

i. Absorciometría radiológica/ fotodensitometría (RA)

ii. Radiogrametría

b. Densitometría de energía simple

i. Absorciometría fotónica simple (SPA)

ii. Absorciometría por rayos X de energía simple (SXA)

c. Densitometría de doble energía

i. Absorciometría fotónica dual (DPA)

ii. Densitometría radiológica de doble energía (DXA, DEXA, QDR)

d. Tomografía computarizada cuantitativa (QTC)

e. Ultrasonido cuantitativo (QUS)

2. Técnicas de medición de la microestructura

a. Histomorfometría

b. MicroTAC

El principio de esta técnica es generar una imagen digitalizada en función de la atenuación de dos haces colimados de rayos X de alta y baja energía (140 y 70 Kv) de un determinado sector anatómico. El cálculo de la densidad se realiza a través de un proceso matemático, que se inicia con la diferenciación del área explorada (cm^2), la determinación del contenido mineral (g) y el cociente de ambos, que origina la densidad por unidad de superficie (g/cm^2) referida al área de proyección (Cobo y *et al.*, 2003).

Fundamentalmente evalúa columna lumbar (hueso trabecular) en proyección antero-posterior y cuello de fémur (hueso cortical); no obstante, existen programas específicos para la exploración lateral de columna lumbar, antebrazo, calcáneo y cuerpo entero, en este último caso aportando, además, información sobre la composición corporal de los tejidos blandos. También se puede evaluar la morfometría vertebral a través de un barrido lateral rápido, ofreciendo una imagen completa de la columna toracolumbar, capaz de identificar fracturas o deformidades vertebrales. El tiempo de exploración es de 6-15 minutos manteniendo dosis de radiación muy bajas de 0,5 a 2,4 mSv (esta última para cuerpo entero) (Cobo y *et al.*, 2003).

La precisión determinada por el coeficiente de variabilidad (CV) es de alrededor del 1-2%, según los sectores anatómicos. El error de exactitud es del 5-10%, la fiabilidad de 94-96% y reproducibilidad del 98-99%. Existen factores que artefactan la determinación de la DMO en columna lumbar; algunos de ellos son corregibles, como los contrastes radiológicos, clips, botones metálicos tejidos sintéticos, etc. Otros son factores intrínsecos, sobre todo relacionados con la edad (más de 65 años) que pueden elevar falsamente los niveles de DMO, como la artrosis, calcificaciones de tejidos blandos, fracturas vertebrales, alteraciones de la estática de la columna, etc. Además, las mediciones incluyen una

cantidad sustancial de hueso compacto al capturar no sólo cuerpo vertebral sino también arcos y apófisis espinosas (Cobo y *et al.*, 2003).

Frente a estas circunstancias intrínsecas se pensó hace algunos años en la DXA lateral de columna lumbar como alternativa, que hace posible una evaluación casi exclusiva de hueso trabecular, evitando las estructuras posteriores. Sin embargo también es frecuente la artefactación por superposición de las costillas o la pala iliaca. La reproducibilidad baja, dado el gran espesor y la poca uniformidad de los tejidos blandos en esta proyección y también la baja precisión de esta técnica (CV 3-4 %) han hecho que prácticamente no se utilice (Cobo y *et al.*, 2003).

Respecto a la cadera, la mayor precisión con menor probabilidad de artefactación se produce cuando se evalúa el total de la región proximal del fémur con CV 1%; por ello se tiende a utilizar como estándar para el diagnóstico. Se pueden evaluar parámetros geométricos que influyen de forma independiente en el riesgo de padecer fractura de cadera, como son la longitud del eje del cuello del fémur (que ha obtenido resultados controvertidos), la anchura media del cuello femoral o el ángulo de inserción del cuello del fémur, que han demostrado en estudios de casos y controles de la población española, ser factores de riesgo independiente, tanto de la edad, como de la masa ósea respecto a la fractura femoral, tanto en la población masculina, como femenina (Cobo y *et al.*, 2003).

En nuestro país los aparatos más utilizados son los de las marcas Lunar®, Hologic® y Norland® que suministran cifras de DMO en g/cm^2 , en t-score (comparando con población joven del mismo sexo) en z-score (comparando con población de misma edad y sexo). Dado que las cifras g/cm^2 difieren de un modelo a otro, se aconseja registrar los valores en t-score y z-score que los hacen más útiles en clínica. La densitometría

DEXA de huesos periféricos nos puede ayudar en el cribado, pero es mejor utilizar la medición lumbar y femoral. (Fig. 8)

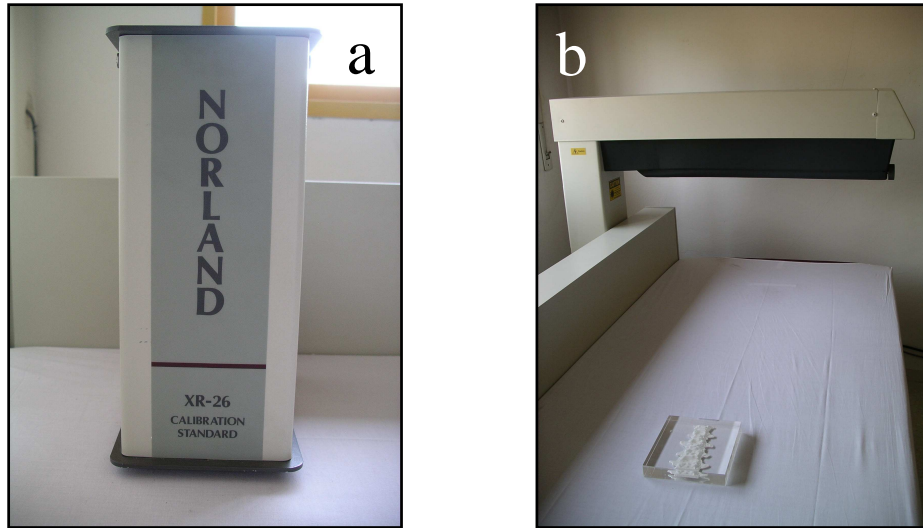


Figura 8. Densitómetro Norland®: (a) Detalle del modelo, (b) Fantomas de columna para calibrar el aparato.

Se han desarrollado equipos de densitometría periférica capaces de determinar la DMO en el extremo ultradistal del radio, diáfisis radiocubital y calcáneo, que tienen la misma precisión y baja exposición radiológica que la DXA axial, aunque poseen limitaciones, como las posibles alteraciones regionales y la escasa respuesta a tratamientos que han demostrados cambios significativos en la DMO axial. Dado que existe una estrecha correlación entre las mediciones de antebrazo de DXA y SXA, seguramente también tengan capacidad para predecir el riesgo de fractura. Es una técnica capaz de predecir este riesgo, muestra de modo preciso la masa ósea, permite el consejo de tratamiento preventivo y ve la respuesta al tratamiento. La mejor capacidad predictiva se produce cuando la evaluación de la masa ósea se realiza en el sector donde se evalúa el riesgo de fractura (Cobo y *et al.*, 2003).

C. La tomografía axial computarizada (TAC) cuantitativa (**QCT**) es la única técnica no invasiva que mide en tres dimensiones la verdadera densidad volumétrica (mg/cm^3) de hueso trabecular o cortical en cualquier localización del esqueleto. Valora el hueso central del cuerpo vertebral, que es el más sensible para detectar los cambios en el contenido mineral óseo. Usada con una ventana vertebral es, entre todos los métodos disponibles en la actualidad, el más sensible para determinar cambios en la masa ósea, pero es poco específica, cara e invasiva (la radiación emitida es mayor que con la radiografía convencional o con la DEXA, 1-10 mSv) (Cobo y *et al.*, 2003).

D. El **ultrasonido** se perfila como una técnica útil (cribaje) para predecir el riesgo de fractura, con las ventajas de ser poco invasivo, barato y poderse realizar de manera ambulatoria. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta prueba tienen baja reproducibilidad, con sólo un 70% de correspondencia con los resultados de la DEXA. Es una técnica novedosa, que no mide masa ósea y que ha sido aprobada por la FDA para la valoración de la osteoporosis (Cobo y *et al.*, 2003).

Evalúa dos factores fundamentales: la atenuación del sonido y la velocidad del sonido. La atenuación o BUA, mide la absorción de la energía del sonido a través del hueso en decibelios por megaherzio. Su información aporta datos sobre la densidad ósea y la cantidad, estructura y orientación de las trabéculas. La velocidad del sonido (VOS o SOS) mide la velocidad con que atraviesa la onda de sonido el hueso en metros partido por segundo. Es el principal parámetro que se correlaciona con las mediciones de masa ósea obtenidas por DEXA. Si la estructura ósea es normal, la atenuación será elevada, pero si el hueso es osteoporótico, la atenuación será baja. De igual forma, si el hueso es compacto, la onda lo atravesará más rápido que si el hueso es osteoporótico, ya que la onda de sonido se transmite mejor en medio sólido que por aire. El *stiffnes* o combinación matemática del

BUA y el VOS, se expresa también en valores t-score y z-score. Resumiendo, un hueso osteoporótico tendrá un BUA, VOS y *stiffnes* bajos, es decir, una t-score y z-score más negativas, al igual que sucede con la densitometría DEXA. Habitualmente se realiza en el hueso calcáneo, ya que su composición es mayoritariamente hueso trabecular (Cobo y *et al.*, 2003).

En un estudio llevado a cabo en el Centro de Salud de Atención Primaria Salvador Allende de Valencia en 115 mujeres postmenopáusicas a las que se les realizó una ultrasonografía ósea de calcáneo, se vio que el 50,4 % presentaban osteoporosis y un 29,6%, osteopenia. Por tanto, el 80 % de las mujeres del estudio tenían alteración de la densidad mineral ósea. Los autores concluyeron que esta técnica podría ser una herramienta útil en atención primaria para el cribado de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas, aunque presenta una serie de limitaciones, como la uniformidad de criterios para el diagnóstico de la enfermedad en estos dispositivos y que no debe ser utilizado para controlar la respuesta al tratamiento, puesto que el esqueleto periférico responde con pequeños incrementos de densidad ósea que coinciden con el error de precisión de los equipos (Reyes Balaguer y Moreno Olmos, 2005).

Los US de calcáneo han demostrado una predicción de fractura igual a la densitometría DEXA, es decir de un 60-70% (Orozco P, 2001), pero los estudios se han realizado comparándola con la DEXA en poblaciones de edad avanzada fracturada y no fracturada. El principal problema está en que todavía no se conoce bien cuál es el punto de corte para evaluar el riesgo de fractura en población no fracturada y más joven.

E. En la osteoporosis el estudio de la **calcemia, calciuria y fosfatemia** es normal. Los niveles de vitamina D pueden ser normales o discretamente elevados. Los parámetros bioquímicos que indican formación ósea son la osteocalcina y la fosfatasa alcalina, y se

miden en suero. Los marcadores de resorción ósea son la hidroxiprolina y las piridinolinas urinarias. La determinación de rutina de todos estos parámetros no está justificada, ya que no predicen el riesgo de fractura ni ayudan a determinar la densidad de masa ósea (Cobo y *et al.*, 2003).

3.2.6.2. Medición de la microestructura

La arquitectura trabecular ósea se ha mostrado como el determinante mayor e independiente de predicción de fractura vertebral en varones con osteoporosis. Se piensa pues, que la microarquitectura ósea juega un papel importante en la resistencia del hueso y sería de gran ayuda para el manejo de la osteoporosis, así como el desarrollo de métodos que valoren esta microestructura y sus alteraciones. La combinación entre el volumen óseo y las variables arquitecturales explican más del 90% de la resistencia ósea (Cobo y *et al.*, 2003).

A. Histomorfometría

Actualmente el método más desarrollado es la histomorfometría, pues permite valorar parámetros que reflejan la estructura y el recambio óseos, a niveles intermedios de organización, en el tejido o la unidad multicelular básica. Se realiza sobre una muestra de biopsia, fijada y cortada en láminas de 5 a 20 μm de espesor; posteriormente se procede a la medición de distintos parámetros histomorfométricos, bien de forma manual, semiautomática o automática. Para medir de manera dinámica el recambio óseo se pueden administrar unos días antes de la toma de la biopsia dos ciclos cortos de 2 y 4 días de tetraciclina oral (10 mg/kg de peso/ día). La sustancia queda depositada a lo largo del frente de calcificación en dos líneas distintas, de esta forma podremos valorar la velocidad de osificación. Los parámetros histomorfométricos se dividen en varios tipos (Cobo y *et al.*, 2003):

A₁. Parámetros de estructura ósea

- Volumen de hueso trabecular: es el porcentaje de tejido óseo esponjoso, incluyendo hueso mineralizado y osteoide.
- Volumen óseo total: es una valoración de masa ósea y puede ser comparada con la medición de la densidad mineral ósea por métodos no invasivos.
- Anchura cortical: es la media del grosor de las corticales.
- Grosor de la pared: representa la cantidad de hueso formado en cualquier unidad de organización ósea intermedia y es la anchura de una trabécula ósea completa.
- Grosor trabecular: separación trabecular y número de trabéculas.
- Estudio de la conectividad trabecular: consiste en contar el número de nodos y terminaciones, valorando la distancia entre nodos, terminaciones y entre nodos y terminaciones. El cociente entre el número de nodos y el número de terminaciones es un índice de la conectividad espacial.
- Volumen estrella: representa una estimación tridimensional del tamaño medio del espacio medular.
- Número Euler: basado en el número de poros y componentes estructurales que están unidos; es una medida directa de conectividad.
- Geometría fractal: describe la complejidad de la estructura, de acuerdo con su disposición espacial.

A₂. Parámetros de formación ósea

- Volumen osteoide: representa la fracción de hueso trabecular que no está calcificada.
- Superficie osteoide: es el porcentaje del total de superficie trabecular ocupado por osteoide.
- Grosor osteoide: la diferencia de la anchura de la unión osteoide.

- Grado de aposición mineral: distancia entre los puntos medios de dos tinciones de tetraciclina; es el grado de progresión del frente de mineralización.
- Superficie de mineralización: extensión de la superficie marcada por tetraciclina expresada sobre la superficie total del hueso.
- Grado de formación ósea: es la suma de mineralización ósea por unidad de superficie trabecular y por día.
- Aposición ajustada: cantidad de hueso mineralizado por día y por unidad cubierta de osteoide.
- Período de formación: tiempo necesario para reconstruir una nueva unidad estructural ósea.
- Tiempo de retraso de mineralización: intervalo entre el depósito de osteoide y su posterior mineralización.

A3. Parámetros de resorción ósea

- Superficie erosionada: es el porcentaje de superficie ósea erosionada que comprende, tanto los sitios de resorción activa, donde hay osteoclastos, como los sitios donde ésta ha cesado pero los osteoblastos no han llegado todavía a rellenar las lagunas de Howship.
- Profundidad de la erosión: número de erosiones lacunares en cada cavidad de resorción por el grosor laminar.

A4. Frecuencia de activación

Es la probabilidad de que un nuevo ciclo de remodelado pueda estar iniciándose en algún punto de la superficie ósea; es el grado de formación por la anchura de la pared y día.

Los índices de mayor poder estadístico son el grosor trabecular, el grado de aposición, el espesor de la pared y la profundidad y número de las erosiones. Según la

heterogeneidad histológica del recambio en la osteoporosis, se pueden dividir éstas en: de recambio alto, bajo o normal, ayudándonos a seleccionar el tratamiento más adecuado. La variabilidad inter e intraobservador de esta técnica es pequeña para todos los parámetros, excepto para la anchura cortical, pues es difícil identificar el límite entre cortical y hueso trabecular.

Hay una gran correlación entre las técnicas manuales y las computarizadas, y la variación entre muestras depende del sitio de la biopsia. La histomorfometría se ha usado para valorar los efectos sobre el remodelado y la calidad óseos en estudios experimentales, así como para valorar los mecanismos de acción, de seguridad y los efectos a largo plazo de algunos tratamientos. Pero en la clínica diaria, las indicaciones de la histomorfometría sólo se darían en pacientes que por historia, signos, radiología o perfil bioquímico, sugieren la posibilidad de osteomalacia, mastocitosis, mieloma no secretor, sarcoidosis, etc., así como en casos graves de osteoporosis no respondedoras a tratamientos habituales.

B. MicroTAC

La microTAC es otro método de valoración de la estructura ósea, que permite realizar reconstrucciones tridimensionales con resoluciones espaciales de hasta 2 μm . Esta técnica se ha utilizado en material de biopsia de numerosos estudios, donde ha mostrado un gran poder de predicción de fracturas en relación con la fragilidad esquelética y la resistencia ósea, medidas por diferentes técnicas de biomecánica. La TAC de alta resolución también se puede usar para valorar la arquitectura del hueso trabecular *in vivo*, con una resolución espacial de 150 μm , aunque no es lo suficientemente fina para permitir una adecuada medición del grosor trabecular (Cobo y *et al.*, 2003).

3.2.7. TRATAMIENTO

Para escoger el fármaco más adecuado se debe etiquetar correctamente al paciente. Si es una osteoporosis secundaria a otra patología, deberemos tratar también esa patología e intentar compensarla o curarla y en determinadas ocasiones, deberemos añadir el tratamiento de la osteoporosis para evitar que pierda más masa ósea. En la actualidad los fármacos comercializados son antiresortivos, es decir lo que hacen es frenar la pérdida ósea y aumentar ligeramente la masa ósea.

En la tabla X (Orozco, 2001) se especifican los datos más relevantes de los fármacos disponibles en nuestro país para el tratamiento de la osteoporosis y su nivel de evidencia antifractura. No están incluidos los que todavía no han demostrado reducción de riesgo de fractura en ensayo clínico aleatorizado como por ejemplo el flúor, la ipriflavona, la testosterona o la tibolona por no considerarse en este momento opciones terapéuticas válidas para el tratamiento de la osteoporosis fuera del contexto de un ensayo clínico.

3.3.7.1. *Revisión por grupos terapéuticos de los principales fármacos utilizados en la osteoporosis*

Los datos sobre eficacia, posología, contraindicaciones, efectos secundarios, controles y nivel de evidencia de fractura, así como su efecto sobre la DMO, se encuentran en las tablas XI y XII, respectivamente (Tablas X y XI).

A. Bifosfonatos

Son compuestos sintéticos análogos al pirofosfato, potentes inhibidores de la resorción ósea. Existen dos grupos farmacológicos: los nitrogenados (alendronato y risendronato) y los pirofostatos (etidronato) con diferentes vías metabólicas de actuación que todavía están en estudio.

Recientemente han aparecido estudios sobre los efectos a nivel cardiovascular de los bifosfonatos. En este sentido el etidronato ha demostrado disminución del grosor de la íntima de la carótida en pacientes diabéticos con osteopenia (Koshiyama *et al.*, 2000) y los bifosfonatos nitrogenados (alendronato) inhiben la formación de la GGPP en la vía del mevalonato de la síntesis de colesterol (Bergstrom *et al.*, 2000).

De forma alarmante, han proliferado los trabajos que relacionan la terapia con bifosfonatos y la aparición de osteonecrosis mandibular, por lo que su utilización en el tratamiento de la osteoporosis está cada vez más en entredicho. (Marx *et al.*, 2005; Zarychanski *et al.*, 2006).

B. Calcitonina (CT)

Es una hormona polipeptídica que inhibe la actividad resorptiva de los osteoclastos. Hoy está prácticamente en desuso.

C. SERMS

Son moduladores selectivos de los receptores estrogénicos; dentro de este grupo está incluido el tamoxifeno (sin indicación autorizada en osteoporosis ya que parece aumentar el cáncer de útero) y el raloxifeno. Están en desuso.

D. Terapia hormonal sustitutiva con estrógenos (THS)

Los estrógenos inhiben la resorción y el *turnover* óseo con independencia de la vía utilizada, pero sus efectos sólo persisten mientras dura el tratamiento (5 años después de dejar la terapia la DMO es similar a la de una persona que nunca haya seguido el tratamiento). Además, en edades superiores a 70 años, la THS no frena la pérdida de la DMO (Santoro *et al.*, 1999). A nivel cardiovascular la terapia mejora el perfil lipídico, la agregación plaquetaria y la fibrinólisis, aunque el efecto varía según el riesgo cardiovascular basal de la paciente (Orozco 2001; Johnston *et al.*, 2000). Los datos de los

ensayos clínicos no confirman el efecto beneficioso sobre el riesgo cardiovascular visto en los estudios observacionales.

E. Calcio

El calcio es un inhibidor del remodelado óseo dependiente de la PTH. Se recomienda una ingesta diaria mínima de calcio de 1000 mg/día y de 1200-1500 mg/día durante el embarazo, la lactancia y la postmenopausia. Los suplementos de calcio (500-1000 mg diarios) tienen un modesto efecto antirresortivo, se ha demostrado que por sí solos, son eficaces para mantener o aumentar la DMO (Panel de expertos de la Sociedad Española de Reumatología, 2003, Orozco 2001).

F. Vitamina D

En el hueso actúa sobre los osteoblastos regulando su mineralización y disminuye la síntesis y la secreción de la PTH. Su déficit produce un aumento de la PTH que producirá un incremento de la resorción del hueso, sobre todo cortical.

Se presenta en forma de vitamina D no activa (calciferol) y activa (calcitriol) y existen combinados de calcio + vitamina D3. Parece ser que el efecto de la vitamina D estándar sobre la densidad ósea es significativamente menor que el de la vitamina D hidroxilada (Cranney *et al.*, 2001).

Tabla X: Resumen de los fármacos utilizados en el tratamiento de la osteoporosis (Orozco, 2001)

FÁRMACO	DOSIS	CONTRA-INDICACIÓN	EFFECTOS SECUNDARIOS	CONTROLES DE TRATAMIENTO	NIVEL EVIDENCIA ANTIFRACTURA
Alendronato	1 comp. De 10 mg/día ó 1 comp. de 70 mg/ semana, tras 2 horas de ayuno, con un vaso lleno de agua corriente y sin reclinarse ni tomar nada durante 30 minutos, para disminuir el riesgo de esofagitis	Problemas esofágicos (ej: acalasia, esofagitis) Hipocalcemia. Insuficiencia renal grave.	Esofagitis y otros trastornos gástricos	Ninguno	Vértebra: A Cadera: A
Etidronato	2 comp. / día durante 14 días cada 3 meses, tras 2 horas de ayuno, con un vaso lleno de agua corriente y sin tomar nada durante 2 horas	Fractura reciente hipocalcemia, Insuficiencia renal grave	Bien tolerado. Nauseas, dispepsia	Ninguno	Vértebra: A Cadera: B
Risedronato	1 comp. de 5 mg/ día, tras 2 horas de ayuno, con un vaso lleno de agua corriente y sin reclinarse ni tomar nada durante 30 minutos	Hipocalcemia, insuficiencia renal grave	Ninguno (falta confirmación en experiencia clínica)	Ninguno	Vértebra: A Cadera: A
Calcitonina	Inhalación nasal de 200 UI / día de CT salmón. No está bien establecida cuál es la dosis eficaz de elcatonina (40 ó 80 UI)	Alergia a las proteínas de pescado	Nasal: rinitis. Inyec.: inflamación local y sofocos	Ninguno	Vértebra: A Cadera: B
Raloxifeno	1 comp. / día con o sin comida. Interacciona con Sintrom® y colestiramina	Sofocaciones, antecedente de tromboembolismo y trombosis venosa, insuficiencia renal o hepática grave, cáncer activo de endometrio o mama (en revisión) hombres y premenopáusicas (en estudio), embarazo	Sofocaciones, tromboembolismo y trombosis venosa, calambres en piernas	Ninguno	Vértebra: A
THS	Variables según mujer: parches de 50 a 100 µg con o sin geatágeno 1 comp. de estrógeno equino conjugado / día	Cáncer mama, endometrio o útero, Antecedente de tromboembolismo y trombosis venosa o pulmonar, hepatopatía severa, Embarazado, hemorragia vaginal	Aumento de riesgo tromboembolismo venoso y cáncer de mama, sangrado vaginal en pauta discontinua, reacción local en parches, mastalgia, cefalea, NO aumenta riesgo cáncer endometrio si se utilizan conjuntamente con progestágenos	Revisión ginecológica, mamografía. Analítica básica	Vértebra: B Cadera: A (si inicio < 60 años)
Vitamina D	Varía según el déficit del paciente y el tipo de vit D: Ej: 800-1000 UI -Colecalciferol o vit D3 -Calciferol ó 25 (OH) D3 Cualquier dosis monitorizada de clacitriol o 1,25 (OH) D3	Hipovitaminosis D, hipercalcemia, osteodistrofia renal con hiperfosfatemia	Ninguna a dosis terapéuticas	Ninguno si se utilizan dosis de hasta 1000 UI/día de 25(OH)D3. Si se utilizan dosis mayores o calcitriol vigilar Ca, P, fosfatasas alcalinas, y calciuria. Si se corrige un hiperparatiroidismo secundario vigilar 25(OH)D3 y PTH	Cadera:A(si déficit)
Calcio	Varía según el déficit de la ingesta del paciente	Hipercalcemia, hipercalciuria (discutible)	Raros a dosis de 1-1,5 g/día	Ninguno excepto si se administra conjuntamente con fármacos que aumentan la absorción de calcio (calcemia, calciuria)	C

Nivel evidencia: A: ensayo clínico randomizado, *B:* ensayo clínico no randomizado o estudios observacionales bien diseñados, *C:* comité de expertos, resultados contradictorios ensayos clínicos.

G. Fármacos anabólicos

Aunque la prescripción antirresortiva es el primer escalón de tratamiento en la osteoporosis, los nuevos agentes osteoformadores o anabólicos representan un importante avance para la terapia de los casos más complejos y graves. Dentro de este grupo, los más esperanzadores son el ranelato de estroncio y la PTH (Fernández-García *et al.*, 2005).

El **fluoruro sódico** estimula directamente la función osteoblástica sin efecto sobre los osteoclastos, pero no ha demostrado reducir la tasa de fracturas y tiene efectos secundarios que limitan su utilización en clínica (Haguenauer *et al.*, 2000; Sowers *et al.*, 2005).

Hormona del crecimiento / IGF-I. La mayor parte de los trabajos realizados con GH han observado cambios mínimos sobre la masa ósea, si bien se trataba de estudios de corta duración (< 1 año). Estos resultados parecen ser la consecuencia de que se activara también la resorción ósea mediada por osteoclastos. Por otro lado, el tratamiento continuado con GH se ve limitado por su elevado coste y los posibles efectos adversos (diabetes mellitus y síndrome del túnel carpiano). Sumando todos estos factores, no parece aconsejable la terapia con GH, sin embargo, en estudios a largo plazo (3-4 años), sí se evidencian beneficios óseos (elevación de la DMO) por lo que su utilización sí tendría una razón de ser, si bien son necesarias futuras investigaciones para dilucidar estas dudas (Fernández-García *et al.*, 2005).

En cuanto al IGF-I, parece que su administración aumenta los niveles séricos de los marcadores bioquímicos de la formación ósea, no alterando prácticamente nada los de la resorción. El problema de la administración crónica de esta hormona son sus efectos nocivos sobre otros tejidos debido a su capacidad proliferativa. Son necesarios más

estudios que se centren en la obtención de análogos de estas sustancias, que eviten además la activación de todo el sistema de remodelado óseo (Fernández-García *et al.*, 2005).

Las **estatinas** elevan los niveles plasmáticos de osteocalcina y disminuyen los marcadores bioquímicos de la resorción ósea, pero actualmente el potencial terapéutico de las estatinas en la osteoporosis es incierto (Fernández-García *et al.*, 2005).

El **estroncio** estimula la proliferación de los osteoblastos e inhibe la formación de los osteoclastos y aunque la mayoría de los trabajos muestran resultados prometedores sobre la reducción del riesgo de fracturas vertebrales, es necesario profundizar sobre los mecanismos de acción de sus efectos biológicos (Fernández-García *et al.*, 2005).

La **hormona paratiroidea (PTH)** tiene un potente efecto anabólico sobre el hueso, aumentando la formación ósea. Ha demostrado reducción del riesgo de fracturas tanto vertebrales como no vertebrales. Si se administra la hormona de forma intermitente, a dosis bajas, se produce un aumento de la masa ósea, produciéndose una estimulación de los factores de crecimiento y disminuyendo la apoptosis osteoblástica. Esta situación dual se conoce como efecto paradójico, pero tiene efectos secundarios que limitan su utilización (Fernández-García *et al.*, 2005).

H. Otros fármacos (Orozco 2001)

La **ipriflavona** es un derivado sintético de la isoflavona. Los datos sobre la prevención de la pérdida ósea postmenopáusica son contradictorios (Agnusdei *et al.*, 1997; Alexandersen *et al.*, 2001; Arjmandi *et al.*, 2000; Minegishi *et al.*, 2002; Deyhim *et al.*, 2005).

El consumo de **soja** se ha asociado a una mayor DMO en población menopáusica japonesa (Horiuchi *et al.*, 2000) y al mantenimiento del CMO al administrarla junto con

isoflavona (Chen *et al.*, 2003), aunque parece no tener efectos significativos en las mujeres jóvenes (Anderson *et al.*, 2002), ni en la menopausia precoz (Gallagher *et al.*, 2004).

Las **tiazidas** actúan aumentando la reabsorción del calcio en la orina. Los datos tras los ensayos clínicos son contradictorios (La Croix *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2000).

La **tibolona** es un esteroide sintético con actividad estrogénica, progestágena y androgénica utilizado como alternativa a la THS que ha demostrado reducción de la pérdida de la DMO lumbar y femoral similar ésta. En 2001, comenzó el LIFT (estudio a largo plazo sobre el efecto de la tibolona en las fracturas), que ayudará a entender las diferencias y similitudes entre los estrógenos y la tibolona; los últimos datos indican su beneficio en la reducción del riesgo de fractura vertebral (Cummings, 2006; Grobbee DE, 2005; Devogelaer 2004).

En el trabajo llevado a cabo por Cranney *et al.* (2001) donde se resumen los meta-análisis de distintos tratamientos de la osteoporosis postmenopáusica, se observa que los mejores resultados en cuanto a DMO total se consiguen con los tratamientos con alendronato y con calcio ($p < 0,01$), pero no en partes del cuerpo en concreto. En cuanto a las dosis, se vio que mayores cantidades de risendronato, alendronato y THS, conseguían mayores densidades, pero no ocurría lo mismo con dosis crecientes de calcio o de calcitonina. Asimismo, a mayor duración del tratamiento con risendronato, alendronato, raloxifeno y THS, mejores resultados en el tiempo en la densidad de la espina lumbar. No se encontraron diferencias significativas con la vitamina D, la calcitonina o el calcio.

Al añadir mayores cantidades de calcio a los tratamiento con vitamina D o alendronato se observan mejores resultados en las DMOs lumbar y total (Cranney *et al.*, 2001).

Los tratamientos con vitamina D hidroxilada, calcitonina, raloxifeno y los bifosfonatos reducen la tasa de fracturas vertebrales. Los resultados con THS son algo contradictorios. En cuanto a las fracturas no vertebrales, sólo el risendronato y el alendronato ofrecen resultados realmente prometedores.

En general, la elección del tratamiento correcto se tiene que basar en varios factores, teniendo en cuenta las características individuales de cada paciente.

Tabla XI . Efectos sobre la DMO en cadera, antebrazo, y cuerpo completo (Cranney <i>et al.</i> , 2002)					
Zona	Intervención (años)	No. de estudios/ pacientes	Diferencia de la media ponderada * (95% CI)	Valor P	Heterogenicidad valor P
Cadera	Calcio	8 (830)	1.64 (0.70, 2.57)	<0.01	0.04
	Vitamina D	6 (896)	1.00 (0.22, 1.78)	0.01	0.32
	Alendronato 5 mg (2 añ.)	8 (8146)	3.37 (30.5, 3.69)	<0.01	0.04
	Alendronato 10–40 mg (2 añ.)	5 (1443)	4.24 (3.45, 5.02)	<0.01	0.05
	Risedronato 5 mg (1.5–3 añ.)	7 (2397)	2.73 (2.32, 3.15)	<0.01	0.85
	Etidronato (1–3 añ.)	8 (800)	2.35 (3.94, 7.44)	<0.01	0.63
	Calcitonina 350–800 IU/wk	9 (513)	3.80 (-0.32, 7.91)	0.07	<0.01
	Raloxifeno (2–3 añ.)	4 (6033)	2.11 (1.68, 2.53)	<0.01	0.13
	THS (2 añ.)	9 (1139)	4.12 (3.45, 4.80)	<0.01	0.16
Antebrazo	Calcio	6 (615)	1.91 (0.33, 3.50)	0.02	<0.01
	Vitamina D	13 (988)	3.26 (0.48, 6.05)	0.02	<0.01
	Alendronato 5 mg (2 añ.)	6 (2646)	1.15 (0.93, 1.36)	<0.01	0.95
	Alendronato 10–40 mg (2–4 añ.)	2 (565)	2.08 (1.53, 2.63)	<0.01	0.30
	Risedronato 2.5–5 mg (1.5 añ.)	1 (648)	0.70 (-0.60, 2.00)	0.29	–
	Etidronato (1–3 añ.)	4 (368)	1.11 (-1.16, 3.38)	0.34	0.24
	Calcitonina 350–800 IU/se.	8 (468)	3.02 (0.98, 5.07)	<0.01	<0.01
	Raloxifeno (1 añ.)	2 (359)	0.65 (-0.06, 1.35)	0.07	0.63
	THS (2 añ.)	14 (1225)	4.53 (3.68, 5.36)	<0.01	<0.01
Cuerpo completo	Calcio	4 (358)	2.05 (0.24, 3.86)	0.03	<0.01
	Vitamina D	4 (547)	0.65 (-0.05, 1.35)	0.07	<0.01
	Alendronato 5 mg (3 añ.)	3 (2497)	1.84 (1.46, 2.21)	<0.01	0.23
	Alendronato 10–40 mg (3 añ.)	2 (469)	2.73 (2.27, 3.20)	<0.01	0.35
	Risedronato	–	–	–	–
	Etidronato (1–3 añ.)	1 (134)	0.97 (0.39, 1.55)	<0.01	–
	Calcitonina	–	–	–	–
	Raloxifeno	2 (511)	1.33 (0.37, 2.30)	0.01	0.11
	THS (1 añ.)	6 (771)	3.50 (1.90, 5.12)	<0.01	<0.01
* Diferencia de la media ponderada calculada mediante un modelo de efecto aleatorio.					

3.3. *HORMONA DEL CRECIMIENTO*

3.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y MECANISMO DE ACCIÓN

3.3.1.1. *Biosíntesis y secreción. Generalidades*

Fue en 1921 cuando se descubrió la presencia de actividad estimulante del crecimiento en extractos de lóbulo anterior de hipófisis bovinas y un cuarto de siglo más tarde, se pudo aislar la sustancia responsable en forma purificada. Hoy se sabe que la GH se sintetiza fundamentalmente en las células eosinófilas, particularmente abundantes en las zonas laterales anterohipofisarias (Devesa *et al.*, 1992).

Químicamente, la hormona es un compuesto polipeptídico, formado por 191 aminoácidos dispuestos en una sola cadena, en la que existen 2 puentes disulfuro que unen las cisteínas que ocupan las posiciones 53 y 182 con las localizadas en las posiciones 165 y 189 respectivamente. Esta estructura, con un peso molecular de 22.650 dalton, conocida como forma 22 K, es la forma principal de secreción de la hormona por la hipófisis anterior y la más abundante, tanto en plasma como en las propias células somatotropas (Fig. 9). Se han identificado una serie de variantes cuya significación fisiológica permanece aún por conocer (García-Barros *et al.*, 2000); de ellas, la más importante, hasta el punto de representar un 20 % del total de GH en la hipófisis, parece ser la forma 20 K, en la que de manera natural, desaparecen los aminoácidos situados desde la posición 32 hasta la 46 (Devesa *et al.*, 1992) (Fig. 9) y la forma 12 K que surge por la acción de ciertas proteasas sobre la cadena de aminoácidos en los puntos 134-150 y que resulta ser más anabolizante que la forma 22 K (Díaz y Devesa 1992).

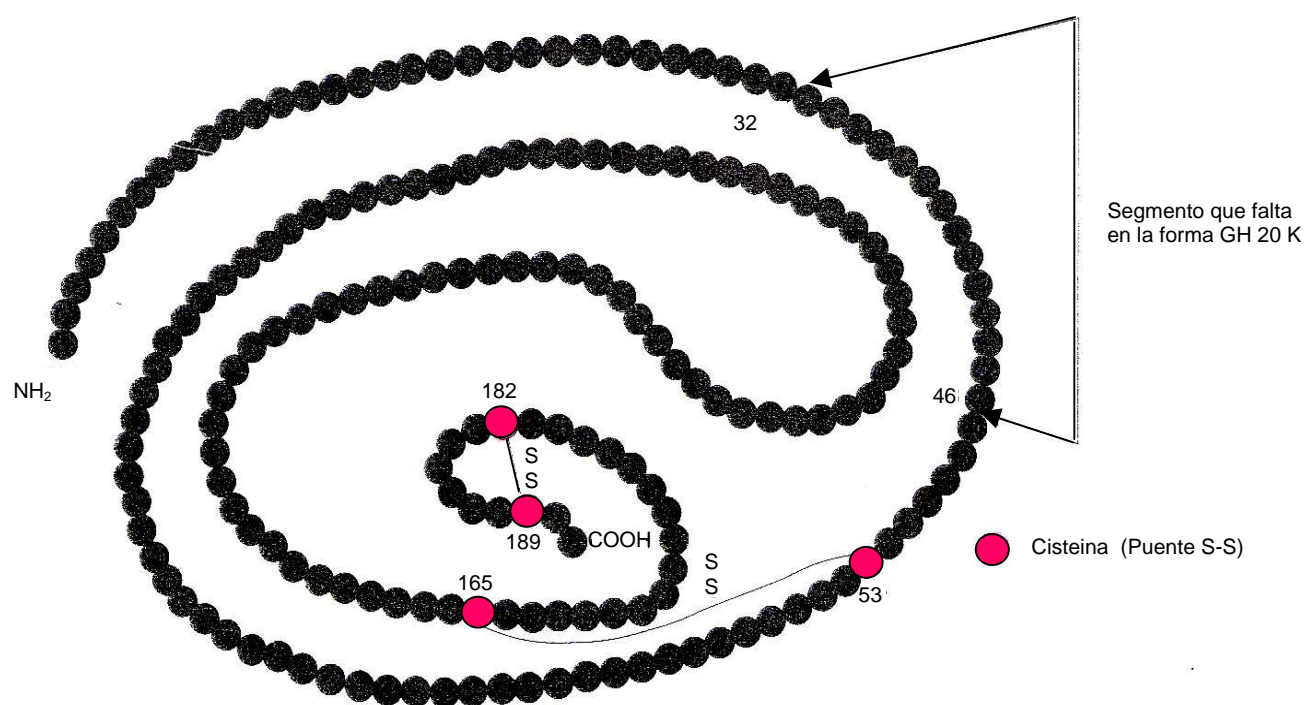


Figura 9. Representación esquemática de la forma molecular de GH 22K, y la variante 20K. (Devesa *et al.*, 1992)

3.3.1.2. Genes para GH

La heterogeneidad comienza ya a nivel de los genes para GH (GH-N y GH-V), localizados en una porción del cromosoma 17. Los resultados de García-Barros *et al.* (2000) sugieren que en la hipófisis se expresan otros genes para GH a parte del hGH-N. A partir del gen primario GH-N, que posee 5 exones separados por 4 intrones, se generan dos mRNA maduros, cuyo mensaje codifica la biosíntesis de las formas 20 y 22 K. Pero existe además un procesamiento postranslacional que lleva a la aparición de formas de GH N-aciladas, desamidadas y una serie de formas oligoméricas que, aunque no parecen ser fisiológicas, sí muestran una mayor bioactividad que la propia forma 22 K. Actualmente se sabe que la GH se compone de un conjunto de péptidos sintetizados como pro-hormonas de 217 aminoácidos y 24 Kda de peso molecular, y que tras proteólisis sucesivas irá dando lugar a otras formas activas.

3.3.1.3. Proteínas transportadoras

Aunque hasta hace poco se pensaba que la GH circulaba en el plasma en forma libre, se ha descubierto recientemente la existencia de dos proteínas transportadoras (GHBP), con lo que una parte de la hormona circula unida a dichas proteínas, formando complejos determinantes de la aparición de lo que anteriormente se conocía como «*big GH* y *big-big GH*» y se atribuía exclusivamente a mezclas de formas oligoméricas. Se sabe que una tiene alta afinidad y baja capacidad (HA-GHBP) y otra, baja afinidad y alta capacidad (LA-GHBP). La proteína de unión de alta afinidad se une a la GH 22 K, mientras que la de baja afinidad se liga a la forma 20 K (Devesa *et al.*, 1996). En estas condiciones, la vida media de la hormona en plasma es de alrededor de 25 minutos, con una tasa de secreción diaria de entre 1 y 2 mg. Se ha observado un aumento de GH libre frente a GH unida a

proteínas durante la pubertad y parece ser este incremento el responsable del “estirón” puberal (Martha *et al.*, 1993).

Se sabe que la regulación de estas proteínas transportadoras depende de factores nutricionales, ya que en el ayuno disminuyen sus niveles y aumentan en la obesidad (Martha, 1994). Curiosamente, el tratamiento con GH no tiene un efecto visible sobre los niveles de GH-BP, más bien es la producción de GH la que se ajusta a los niveles plasmáticos de GH-BP/receptor que son característicos de cada individuo (Martha *et al.*, 1992), estando estos niveles directamente relacionados con el índice de masa corporal y siendo inversamente proporcional a la concentración media de GH de 24 horas (Martha *et al.*, 1993).

3.3.1.4. *Receptores de GH*

Como ya se ha comentado anteriormente, la hormona del crecimiento puede circular libremente en el plasma, ya que pertenece al grupo de hormonas peptídicas, aunque lo suele hacer unida a proteínas plasmáticas que aumentan su vida media. Para producir su efecto, la GH tiene que unirse a un receptor específico.

El receptor de la GH (GHR) es una proteína de 620 aminoácidos y 130 kDa de peso molecular, situada en la membrana celular, que consta de tres regiones: intracelular, transmembrana y extracelular. Se sabe que está codificada por un único gen localizado en el cromosoma 5 (Devesa *et al.*, 1996). Existen receptores para GH en fibroblastos, osteoblastos (Barnard *et al.*, 1991, Nilsson *et al.*, 1995; Ohlsson *et al.*, 1994), tejido adiposo, linfocitos, pero sobre todo en músculo e hígado. Los receptores para GH se localizan preferentemente en la membrana de las células-diana, pero también se han aislado receptores en el citoplasma y en el núcleo.

Actualmente se considera la pertenencia del GHR a la superfamilia de receptores hematopoyéticos (Costoya *et al.*, 1999). Dentro de éstos se encontrarían los receptores para prolactina, eritropoyetina, IL-2, -3, -4, -5, -6, -7 y -9, GM-CSF, LIF e IF α , β y χ .

Se ha observado que cada molécula de GH se une a dos moléculas de receptor. De esta forma tiene lugar un fenómeno de dimerización de ambos receptores, formándose puentes disulfuro. Esto implica que para que se produzca el efecto biológico de la hormona es preciso una concentración adecuada de la misma. De tal forma que si ésta es muy elevada, no se formarán dímeros y el efecto biológico no tendrá lugar.

Cuando la GH se liga al receptor situado en la membrana de las células diana, se produce la homodimerización de dicho receptor, que da como resultado la asociación y activación de la JAK2, la tirosin kinasa asociada al GHR. Una vez activada la JAK2, ésta induce la fosforilación de la cascada de moléculas implicadas, incluyendo a la propia kinasa y a la porción citoplasmática del receptor. Entonces, la fosforilación de la tirosina tanto del JAK2 como del receptor deja al descubierto los lugares de anclaje para las moléculas que contienen el dominio SH2, entre las que se incluyen el STAT, proteínas, fosfatasas, los substratos -1 y -2 del receptor insulínico (IRS1 y -2) y PI-3K (fosfoinositol 3-kinasa), así como ciertas moléculas implicadas en la activación de la vía proteín-kinasa activada por Ras/mitógeno (Costoya *et al.*, 1999, Ohlsson *et al.*, 1998).

En contra de lo que ocurre con otras hormonas peptídicas, la GH también puede ser internalizada tras unirse al receptor, esto es, se produce una invaginación de la membrana a la altura del complejo hormona-receptor, dando lugar a un endosoma, lo que permite su acumulación en los distintos compartimentos celulares (Devesa *et al.*, 1996). De este

modo, es capaz de alcanzar el núcleo de la célula diana, ya sea como GH intacta o como producto de la degradación lisosómica.

En los osteoblastos de ratón, se ha visto que la GH induce los protooncogenes nucleares *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* y Jun B (Zhu *et al.*, 1998; Hodge *et al.*, 1998) y se ha constatado que la transmisión de la señal depende de una forma de proteinkinasa C.

La regulación de la expresión del receptor viene determinada por la presencia de factores nutricionales principalmente, pero también por factores hormonales. Así, en ratas sometidas a ayuno, se observa una disminución en el número de receptores (Devesa *et al.*, 1996). La propia GH juega un papel importante en la regulación del GHR, ya que el tratamiento con esta hormona provoca un aumento de la fosforilación de las proteínas JAK2 y STAT3 asociadas al GHR, por lo que induce su activación (Costoya *et al.*, 2000).

Se sugiere la existencia de un *feed-back* local del eje GH-IGF a nivel de los tejidos. Por tanto, y de forma hipotética, el IGF disminuye el número y la actividad de los GHRs, regulado finamente por la presencia de IGFBPs (Slootweg *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1996). Leung y colaboradores (1996) sugieren que este *feed-back* del eje GH / IGF-I en el tejido óseo puede implicar tres mecanismos:

- El IGF-I producido y segregado por el hígado inhibe la secreción de GH en la glándula pituitaria.
- El IGF-I producido en hueso inhibe también la secreción de GH pituitaria.
- El IGF-I producido en hueso inhibe la acción local de GH al reducir la disponibilidad de GHR.

El ácido retinoico es otro factor que modifica la expresión de GHR incrementando su número en osteoblastos de ratón (Slootweg *et al.*, 1997).

Se sabe que los estrógenos ejercen importantes efectos sobre el tejido óseo, y se ha observado que interactúan con la acción de la GH a nivel celular. En osteoblastos humanos y de ratón, el 17 β -estradiol favorece la proliferación estimulada por GH e incrementa la unión de [125 I] GH y los niveles de mRNA de GHR (Slootweg *et al.*, 1997).

Asimismo, altos niveles de glucocorticoides inducen un incremento en la unión de [125 I] GH y en los niveles de GHR en células de osteosarcoma en ratas y en osteoblastos humanos.

Por el contrario, los niveles altos de corticosteroides disminuyen los efectos de GH en osteoblastos y en condrocitos de la placa de crecimiento de ratas (Jux *et al.*, 1998).

3.3.1.5. Control de la secreción de GH

Hacia el final del primer trimestre del embarazo se puede ya detectar GH en el suero fetal en concentraciones progresivamente crecientes hasta la semana 20 de gestación. A partir de entonces comienza un lento declinar, hasta que hacia el primer año de vida encontramos ya, en condiciones basales, niveles circulantes de la hormona similares a los que se observan en el adulto. Como la GH no parece jugar ningún papel en el crecimiento fetal, la existencia de tan altos niveles de la hormona puede estar dirigida a la diferenciación durante los procesos de organogénesis. Tras el nacimiento, tanto en el hombre como en todos los animales estudiados, se ha demostrado que existe un patrón ultradiano de secreción espontánea de GH, con episodios de brusca liberación que, en nuestra especie, aparecen entre 4 y 8 veces en cada período de 24 horas. Existe, por tanto, un ritmo secretor endógeno cuya máxima amplitud se alcanza en la primera fase del sueño de ondas lentas.

En la actualidad existen abundantes evidencias indicativas de que la secreción de GH depende de la actuación concertada, a nivel hipofisario, de dos péptidos hipotalámicos: GHRH (estimulante) y SS (inhibidor), que llegan por vía portal hipotálamo hipofisaria a las células somatotropas.

El origen del patrón rítmico de secreción pulsátil de GH ha sido muy estudiado, habiéndose observado que la aparición de cada episodio secretor de GH viene determinada por la liberación de GHRH a la circulación portal, con la disminución simultánea del tono inhibitorio que la SS ejerce sobre las células somatotropas. De esta forma, se establecería un ritmo de secreción, con GHRH y SS desfasados en 180°. También es posible que la secreción episódica de GH ocurra por una secreción más o menos continua de GHRH modulado en su actuación por una secreción rítmica de SS.

La secreción rítmica no es sólo privativa de la GH, sino que aparece en muchas hormonas, en donde puede llegar a ser determinante de la acción biológica. Esta secreción pulsátil estaría encaminada a evitar los procesos de desensibilización en los receptores para GH de los tejidos diana.

Admitida la significación funcional de la secreción pulsátil de GH, el problema pendiente de resolver es saber cómo se establece el ritmo previo de secreción de GHRH y SS determinante de aquél (Devesa *et al.*, 1992).

3.3.1.6. GHRH

Desde el punto de vista bioquímico, se trata de un péptido perteneciente a la familia glucagón-secretina, estructuralmente similar al péptido histidina isoleucina (PHI) previamente aislado del tracto gastrointestinal. En el hipotálamo humano, se presenta bajo dos formas moleculares, de 40 y 44 aminoácidos, con similar actividad biológica, fabricadas a partir de dos precursores, prepro-GHRH, compuestos por 107 ó 108

aminoácidos, cuyo gen se localiza en el cromosoma 20.

El mayor cúmulo de cuerpos neuronales productores de GHRH se encuentra en el hipotálamo mediobasal, particularmente en los núcleos arcuato y ventromedial. Del núcleo arcuato parte una densa trama de proyecciones axónicas hacia la eminencia media, donde descargan en el plexo vascular primario del sistema porta hipotálamo-hipofisario. También está presente en las células del sistema inmunitario y recientemente se ha visto que, *in vitro*, modula la secreción de IL-6 de las células humanas mononucleares de sangre periférica (Siejka *et al*, 2005).

El GHRH es sumamente específico, induciendo la liberación hipofisaria de GH, y estimulando la transcripción del gen de dicha hormona y los procesos de diferenciación de las somatotropas primarias.

Al igual que otras hormonas peptídicas, el GHRH pone en marcha sus acciones biológicas tras ligarse a un receptor de membrana en las células somatotropas mediante el estímulo del AMPc, que lleva a la activación de las proteinkinasa I y II, inductoras de la fosforilación de sustratos proteicos que actúan como mediadores intracelulares. Por otra parte, la GHRH produce además una muy rápida movilización de calcio, paralela a la liberación de GH; este mecanismo parece independiente de la generación de AMPc. La acción del calcio iónico está mediada por su unión a la calmodulina.

De los datos expuestos resulta, por tanto, que la liberación de GH inducida por GHRH no es solamente consecuencia de la activación del sistema de adenilato-ciclase, sino que también participa, y de forma coordinada, el sistema calcio-calmodulina.

La GHRH podría inducir también la proliferación de las células somatotropas, incrementando el número total de células productoras de GH.

La actividad biológica de GHRH reside en sus primeros 29 aminoácidos. Esta es la razón por la que se han desarrollado péptidos sintéticos (GRF 1-29), que poseen la

misma potencia que las formas naturales, y que por ello se utilizan en clínica.

3.3.1.7. Factores metabólicos y secreción de GH

Puesto que la GH es un importante regulador metabólico, parece lógico que, a su vez, la secreción de esta hormona pueda estar modulada por los niveles circulantes de principios inmediatos y/o metabolitos. De esta manera, las variaciones plasmáticas de glucosa, ácidos grasos y determinados aminoácidos van a ser importantes condicionantes en el funcionalismo somatotropo.

Glucosa. La elevación aguda de la glucemia en el individuo normal va a inhibir la secreción de GH, mientras que el descenso relativo de su concentración plasmática (brusco y mayor del 40-50 por ciento), va a ser un potente factor estimulante. Estas variaciones bruscas de la glucemia son detectadas por unas neuronas localizadas en el hipotálamo ventromedial y ventrolateral.

La glucosa inhibe la secreción de GH aumentando la liberación de SS, bien a través de la activación de las neuronas glucoceptoras citadas o bien porque las propias neuronas SS son capaces de responder directamente al azúcar. Así, el descenso de la glucemia inhibirá la liberación de SS, con el consiguiente incremento de GH, que tiende a incrementar los niveles de glucemia.

Ácidos grasos (FFA). El cambio agudo en los niveles circulantes de FFA produce los mismos efectos cualitativos sobre la secreción de GH que las variaciones de glucemia. Así, el aumento de FFA tiene carácter inhibitor y su disminución estimula la liberación de la hormona de crecimiento. Probablemente la regulación por FFA sea bastante más potente que por glucosa, pues su elevación plasmática inhibe los picos de GH asociados al sueño, lo que no ocurre con la infusión de glucosa.

Curiosamente, pese a que el efecto neto de glucosa y FFA es cualitativamente similar, las neuronas hipotalámicas que responden a las variaciones de glucosa también responden a las variaciones de FFA, aunque de forma opuesta. La significación fisiológica de este fenómeno se desconoce.

El estímulo de la secreción de SS y/o un efecto inhibitorio directo a nivel hipofisario, sería el mecanismo por el que los FFA inhiben la liberación de GH; lo que podría explicar el comportamiento distinto de los FFA y la glucosa sobre las neuronas hipotalámicas, pese a que el resultado obtenido sobre la secreción de GH sea el mismo.

Aminoácidos. Aunque no todos los aminoácidos se muestran activos en el control de GH, algunos, como arginina y ornitina fundamentalmente, son potentes estimuladores. Parece que su acción se basaría en la estimulación del GHRH hipotalámico.

3.3.1.8. *Control central de la secreción de GH*

El control primario de la secreción de GH parece establecerse en estructuras extra o suprahipotalámicas. Existiría entonces un marcapasos central determinante de la puesta en marcha del ritmo basal de secreción alternante de GHRH y SS, que llevaría al patrón de secreción espontánea de la hormona. Este patrón básico sería de carácter ultradiano, con un ciclo de entre 3 y 5 horas según la especie animal. De forma ya clásica, se conoce la existencia de una íntima relación entre sueño y secreción de GH, de forma que entre media y una hora después de iniciado el sueño de ondas lentas, se produce un gran episodio secretor de la hormona. La hipótesis actual es que esta gran bolsa de liberación de GH estaría ligada al ciclo luz-oscuridad, actividad-descanso, cuyo mediador es el núcleo supraquiasmático. Es probable, por tanto, que la información procedente de este centro, bien directamente vía ganglio cervical superior o tras su actuación sobre la glándula pineal (modulando la liberación de melatonina) establezca el ritmo alternante de base GHRH-SS. También las vías

colinérgicas y α adrenérgicas podrían jugar aquí un papel relevante. Desde un punto de vista funcional, la gran secreción de GH asociada al sueño serviría para la regeneración tisular tras la actividad diaria.

La propia GH juega un importante papel regulador de su propia secreción. El mecanismo sería del tipo retroalimentación negativo corto, mediante una combinación de incremento de síntesis y liberación de SS y disminución de liberación de GHRH.

Los glucocorticoides (GCs) tienen una función relevante en la fisiología del eje hipotálamo-somatotrofo ya que aumentan la transcripción génica de GH así como la síntesis del receptor de GHRH. Pero el exceso de estas hormonas inhibe la liberación de GH mediante el aumento de la secreción hipotalámica de SS, mediada por el incremento de la respuesta beta-adrenérgica inducida por GCs (Devesa *et al.*, 1995).

Toda esta serie de factores determinan que el control de la GH sea muy complejo, como puede verse en la figura 10 (Fig. 10).

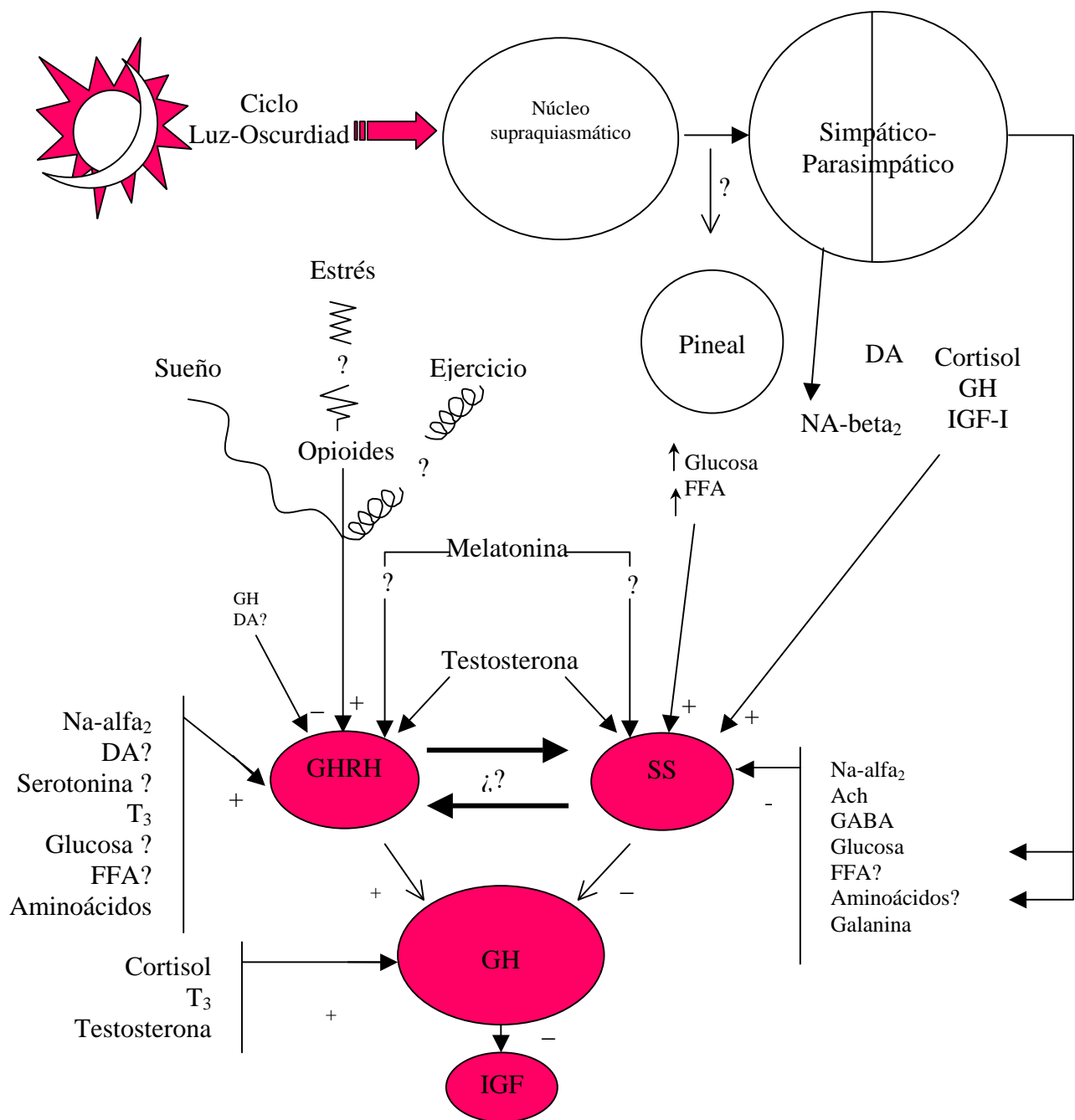


Figura 10. Regulación de la secreción de GH (+ estimula; - inhibe). (Modificado de Devesa *et al.*, 1992)

3.3.1.9. Somatomedinas (IGF)

En un estudio realizado por Salmon y Daughaday en 1957 se observó que, *in vitro*, la hormona GH no era capaz de estimular el crecimiento del cartílago, lo que sí ocurría cuando al cultivo se le añadía plasma de animal normal. Estos autores, entonces, postularon la existencia de un factor plasmático responsable, diferente pero dependiente de GH, ya que no se encontraba en el plasma de animales hipofisectomizados, pero reaparecía cuando éstos eran tratados con GH exógena (Devesa *et al.*, 1992).

A este factor se le denominó factor de sulfatación, ya que su acción básica era la de estimular la incorporación de sulfato a los proteoglicanos del cartílago. Más tarde se constató que también podía intervenir en bastantes actividades metabólicas, pasando a ser conocido con el término somatomedina, con el que se expresaba su actividad de mediador del crecimiento somático.

Actualmente, se sabe que lo que anteriormente se denominaban somatomedinas son, en realidad, dos formas peptídicas estructural y funcionalmente similares a la insulina, por lo que se propuso el término de “*Insulin-like Growth Factors*” (IGF I y II) con el que se resalta tanto su analogía con la hormona pancreática como su papel sobre el crecimiento. Como no se ha llegado a establecer un consenso general, hoy se siguen manteniendo indistintamente ambas denominaciones (Devesa *et al.*, 1992).

A. Estructura y distribución

Desde un punto de vista químico, el IGF-I es un péptido básico compuesto por 70 aminoácidos con un peso molecular de 7.469 daltons, que presenta una secuencia aminoacídica muy similar a la de la proinsulina. El IGF-II está compuesto por 67 aminoácidos y es también muy similar a la proinsulina.

Los IGF no parecen sintetizarse de forma especial en ningún órgano en particular. El hígado parece ser el principal lugar de producción y la fuente primordial de IGF circulante, aunque esto no significa que desde un punto de vista fisiológico sea el más importante, ya que también se sintetiza en el propio tejido condral (Isaksson *et al.*, 1987) bajo el estímulo de la GH (Tresguerres, 1992). Numerosos tejidos son capaces de sintetizar estos péptidos, permitiendo así que actúen localmente estimulando el crecimiento de manera auto y paracrina. Según esto, la GH actuaría como estimulante de la multirrespuesta tisular de fabricación de somatomedina y crecimiento locales.

B. Proteínas transportadoras

En plasma, solamente un 1 % del IGF total circula en forma libre. El 99 % restante lo hace ligado a proteínas transportadoras (IGFBP) por lo que tienen una vida media muy larga. Forman complejos, (se han identificado seis: de IGFBP-1 a IGFBP-6) entre los que destaca el IGFBP-3, principal forma de transporte de IGF-I y II, controlado directamente por la GH (más del 80% de los IGFs plasmáticos se hallan circulantes como parte de un complejo dependiente de GH, de 150 kDa, que se compone de tres unidades: IGF-I o II, IGFBP-3 y una subunidad ácido lábil o ALS).

La función de estas proteínas no sería solamente de transporte como tal, sino la de establecer un reservorio plasmático de IGF ya que mientras el IGF libre posee una vida media corta, de unos 10-20 minutos, la del complejo 150 K es de unas 18 horas, haciendo que los niveles plasmáticos se mantengan de forma bastante estable. Sin embargo, parece que es la forma libre la biológicamente activa pues mientras en la pubertad el aumento de secreción de GH no va acompañado de un aumento importante de IGF total en el plasma, los niveles de IGFBP 35 K disminuyen, permitiendo al organismo disponer de una mayor

fracción libre del péptido, lo que se asocia al mayor crecimiento de este período. Esta unión a las proteínas es lo que impide sus acciones tipo insulina.

C. Receptores de IGF

A nivel celular existen dos tipos de receptores para IGF: el tipo I, con gran afinidad para IGF-I, intermedia para IGF-II y poca para insulina; y el tipo II, que reconoce preferentemente IGF-II, sin ligar insulina. La concentración de estos receptores en la superficie celular está en relación inversa con los niveles de IGF y se observan fenómenos de *down-regulation* (desensibilización).

D. Control de IGF-I

La GH estimula la secreción de IGF-I, por el hígado y seguramente también por otros tejidos, de forma que mientras en el plasma de sujetos con déficit de esta hormona existe una disminución de los niveles de IGF-I (que rápidamente revierte al administrar GH exógena), está sumamente aumentada en los pacientes acromegálicos.

Existe un circuito de tipo *feed-back* entre GH e IGF-I. La elevación de la somatomedina C circulante determina una inhibición de la liberación de GH, por estímulo de la secreción de SS hipotalámica, aunque no se descarta el que también pueda tener una acción inhibitoria sobre GHRH o incluso directa sobre las células somatotropas. Hay otras hormonas como la insulina o las hormonas tiroideas que también contribuyen a que la biosíntesis de IGF se desarrolle normalmente. Los esteroides sexuales juegan al parecer un papel más importante. Durante la pubertad, los cambios en sus niveles plasmáticos parecen ser precisamente la causa del incremento del IGF-I que aparece en el “estirón puberal”.

La síntesis hepática de IGF-I depende marcadamente del estado nutricional del organismo. Así, en situaciones de desnutrición, aunque sea normal la secreción de GH, los

niveles plasmáticos de IGF-I son muy bajos. La normalización del estado nutricional se acompaña de la recuperación de los valores normales del péptido, ya que el organismo precisa de una adecuada entrada de calorías y del aporte de aminoácidos esenciales para biosíntesis hepática de IGF-I.

Tras la madurez sexual, con la edad, los niveles plasmáticos de este factor van decayendo, de forma bastante paralela a lo que ocurre con la secreción de GH. Sin embargo, la concentración de IGF-II no depende de la edad y alcanza niveles tres veces superiores a los de IGF-I. Su función está todavía por descubrir, pero se ha relacionado con el desarrollo fetal (Spagnoli y Rosenfeld, 1996) y con la regulación de la grasa corporal (Helad *et al*, 2006).

E. Acciones biológicas de IGF-I

Atendiendo a su latencia de acción podríamos distinguir aquellos efectos de IGF-I que ocurren de forma aguda y los que se manifiestan más tardíamente. Los primeros son tipo insulina, mientras que los efectos crónicos se muestran preferentemente en el ámbito del crecimiento y la diferenciación celular.

Efectos agudos. Las acciones tipo insulina se caracterizan por un rápido descenso de la glucemia, debido al aumento de la captación celular de glucosa y al incremento de la glucogenogénesis, lo que está muy relacionado con el crecimiento óseo, puesto que el IGF-I es 50 veces más potente que la insulina en la síntesis de glucógeno; teniendo en cuenta que la concentración plasmática de IGF-I es dos mil veces mayor que la de insulina, parece ser su unión a las proteínas plasmáticas lo que evita un estado de hipoglucemia permanente. La latencia en la recuperación de la glucemia basal es idéntica tras insulina o Sm C. También se produce una disminución de los niveles plasmáticos de FFA, que se recuperan más rápidamente cuando se administra IGF-I.

Efectos crónicos. El IGF-I actúa como un débil mitógeno, y un potente factor de diferenciación que mantiene a las células en un estado altamente diferenciado. En este sentido estimula la síntesis de DNA y la proliferación celular en un gran número de tipos celulares: fibroblastos, condrocitos, músculo liso, células de Sertoli testiculares y células de la granulosa ovárica.

Su administración produce (además de los efectos metabólicos agudos citados) las siguientes acciones de tipo hormonal: incremento de la velocidad de crecimiento, aumento del espesor de la epífisis tibial (expresión del efecto sobre los condrocitos), aumento de la incorporación de timidina y sulfato al cartílago, y aumento del peso de órganos tales como riñón, bazo y timo. Además, juega también importantes papeles locales de tipo auto- y paracrino.

En lo que al crecimiento óseo se refiere, tanto la GH como los IGFs, fundamentalmente IGF-I, son capaces de estimular el crecimiento óseo, de forma dosis-dependiente, por estimulación directa de los condrocitos epifisarios (Isaksson *et al.*, 1982. Russell y Spencer, 1985). Cuando se administra GH de forma local, ejerce sus efectos sobre las células condroprogenitoras, estimulando su proliferación y diferenciación, mientras que el IGF-I actúa sobre los condrocitos ya maduros, estimulando tanto su proliferación como la síntesis de la matriz (Carrascosa y Audi, 1996). No se han comprobado sus efectos sobre la mineralización del cartílago de conjunción, a diferencia de lo que ocurre con la T₃, que estimula la mineralización del cartílago y no la proliferación celular (Carrascosa y Ferrández, 1992).

Por otro lado, IGF-I y II son los factores de crecimiento más abundantes en el hueso y estimulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (Canalis *et al*, 1989 b), a la vez que potencian la síntesis de colágeno e inhiben su degradación. Las acciones de estos

IGFs están reguladas por la IGFBP-3, cuya producción *in vivo* está bajo el control de la GH (Tresguerres, 1996). Se sabe que la IGFBP-5 estimula la proliferación de osteoblastos directamente y a través de IGF-I, por lo que podría mediar en las acciones anabólicas de la GH sobre el hueso (Chihara y Sugimoto, 1997). Se ha implicado a los IGFs como mediadores de los efectos que varias hormonas poseen sobre el *turn-over* óseo: GH, estrógenos, progesterona, esteroides, PTH (Canalis *et al*, 1989 a), incluso BMP y citoquinas (Langdahl *et al*, 1998). IGF-I se encuentra en la matriz ósea en una proporción entre 10 y 15 veces menor que IGF-II, por lo que podría ser éste el que actúe en el hueso.

Es muy probable que insulina e IGF-I sean hormonas que no sólo presenten una gran homología estructural y evolutiva, sino también productos fisiológicamente relacionados para actuar de forma concertada en el organismo: la insulina sería responsable de la regulación aguda de la homeostasis metabólica y de los depósitos energéticos, mientras que IGF-I se encargaría principalmente de la diferenciación celular y de los lentos procesos de crecimiento. Estas sustancias serían, entonces, los dos principales compuestos anabolizantes, que permitirían que la regulación metabólica, el crecimiento y la diferenciación celular ocurriesen de manera concertada.

Un estudio de Ohlsson y colaboradores (2000) desmonta parcialmente la hipótesis clásica de la regulación de la somatomedina en la que se postula que la mayor parte del IGF-I que circula en la sangre se sintetiza en el hígado y que el crecimiento corporal está controlado por la concentración de este factor en sangre. Utilizaron ratones en los que abolieron la producción hepática de IGF-I mediante el sistema recombinante Cre/loxP. Los animales experimentaron una reducción de los niveles en suero de IGF de más del 75% asociado con un aumento de los valores de GH sérica. Por el contrario, demostraron un

crecimiento postnatal normal, lo que indica que la acción autocrina/paracrina del IGF extrahepático es el factor determinante en el crecimiento postnatal. Proponen una “hipótesis dual de la somatomedina” según la cual: (1) el IGF-I autocrino/paracrino es el principal determinante del crecimiento corporal postnatal y (2) la acción endocrina del IGF-I sintetizado en hígado tiene un efecto negativo sobre la retroalimentación de la secreción de GH y posiblemente tenga también otros efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos.

3.3.2. ACCIONES GENERALES DE LA GH

3.3.2.1. Acciones biológicas de GH.

A. Crecimiento

La GH estimula el crecimiento somático y actúa sobre el metabolismo intermediario estimulando el anabolismo proteico y la lipólisis. La marcada acción anabolizante de la GH se hace patente de forma inmediata tras la administración de la hormona a animales hipofisoprivos o niños GH-deficientes por activación de todos los procesos implicados en la neosíntesis proteica. En estas situaciones, el balance nitrogenado, negativo, pasa a ser fuertemente positivo, con disminución de los niveles plasmáticos de aminoácidos y urea, así como de la excreción urinaria de este catabolito aminoacídico. La hormona de crecimiento promueve un mayor aporte de aminoácidos a los tejidos, facilitando los procesos de biosíntesis y disminuyendo los del catabolismo proteico. Paralelamente, se produce una mayor retención de potasio, fosfato, magnesio, calcio, sodio y cloruro. Aunque los efectos anabolizantes de la hormona de crecimiento ocurren en tejidos tan distintos como hueso, cartílago o músculo, y en una variada serie de vísceras (corazón, pulmones, hígado, riñones, intestino) y glándulas (páncreas, suprarrenales), quizá es en músculo e hígado donde alcanzan mayor expresión.

A nivel muscular se observa un incremento del transporte de aminoácidos al interior de la célula, que aparece rápidamente y es bloqueable por inhibidores de la síntesis proteica. Unas horas más tarde hay un claro aumento del RNA ribosómico, de la síntesis de DNA y de la neosíntesis proteica. Estos mismos fenómenos se observan en el hígado, donde la GH promueve la fabricación de un gran número de proteínas (entre ellas el IGF-I) y de ácidos nucleicos.

La síntesis de nuevas proteínas es un fenómeno clave para el crecimiento, tanto somático como visceral. El crecimiento somático va a efectuarse fundamentalmente a expensas del crecimiento óseo que, tras el nacimiento, va a ser directamente dependiente del sistema GH- IGF, aunque otras hormonas, principalmente las tiroideas y los esteroides sexuales, también van a jugar un importante papel modulador local.

El crecimiento del hueso puede ser en longitud y en espesor. El desarrollo longitudinal depende del cartílago de crecimiento, que bajo la acción de la GH determina el alargamiento diafisario, mientras que el aumento de espesor se produce por aposición perióstica. Histológicamente, el cartílago de conjunción o crecimiento es una zona de gran multiplicación de condrocitos, que bioquímicamente se caracteriza por una intensa síntesis de grandes moléculas del grupo de los proteoglicanos, responsables de la estructuración de la trama ósea (Fig. 11). Durante el desarrollo, tanto la proliferación celular como la síntesis de macromoléculas están perfectamente compensadas, de tal forma que pese a la constante neoformación ósea siempre existe un espesor de cartílago que permite que el proceso continúe. Tras la pubertad, el aumento de niveles circulantes de esteroides sexuales, al bloquear la proliferación del cartílago y dar lugar a su desaparición, va a poner fin al crecimiento longitudinal del organismo. El crecimiento óseo va a depender fundamentalmente de la GH, con la excepción de la mayor parte de los huesos del cráneo y cara, en los que la regulación parece primordialmente intrínseca genética y no GH-de-

pendiente.

Si un niño presenta un déficit de GH, éste dará lugar al cese o disminución del crecimiento lineal, ya que se interrumpen los procesos de proliferación y transformación de los condrocitos y se adelgaza el disco epifisario. El tratamiento con GH exógena estimula la condrogénesis y la aparición de osteoblastos. Sin embargo, sigue sin estar totalmente claro el mecanismo de actuación de la hormona.

Desde el punto de vista bioquímico, se ha comprobado que en cartílago y hueso la GH incrementa la incorporación de SO_4 a los proteoglicanos, la incorporación de timidina en el DNA condrocítico y la conversión de prolina en hidroxiprolina en el colágeno. El que estos efectos no se observasen *in vitro* hizo suponer que la hormona no actuaba directamente, sino a través de un factor presente en el plasma de sujetos normales, pero ausente en los GH-privos que, como ya se ha comentado anteriormente, posteriormente fue identificado y denominado somatomedina (mediador de la acción de la hormona somatotropa).

La acción de la GH sobre el crecimiento óseo longitudinal queda así subordinada a la fabricación periférica, en tejidos tales como el hígado, de un factor mediador responsable último de esta acción, estableciéndose entonces un eje GH - somatomedina - crecimiento.

Datos más recientes, sugieren, sin embargo, la existencia de un sistema mucho más complejo, según el cual la propia hormona sería capaz de actuar también directamente sobre el cartílago de crecimiento. Así, la GH y la somatomedina estimularían diferentes poblaciones de condrocitos y la GH induciría directamente la diferenciación de estas células, haciendo que expresen el gen codificador de somatomedina. Los condrocitos diferenciados comenzarían a producir somatomedina, y ésta desencadenaría la proliferación clonal y maduración de nuevos condrocitos por

mecanismos auto o paracrinós.

De esta forma, en la secuencia ordenada de acontecimientos que tienen lugar en la maduración celular en el cartílago, y que llevan el crecimiento longitudinal del hueso, la GH sería el primer desencadenante y la somatomedina el segundo.

Una vez que se fusionan las epífisis por acción de las hormonas sexuales, tras la pubertad, la hormona ya no es capaz de continuar induciendo crecimiento lineal del hueso, aunque sí persiste un efecto sobre el ensanchamiento de éste a expensas del crecimiento perióstico.

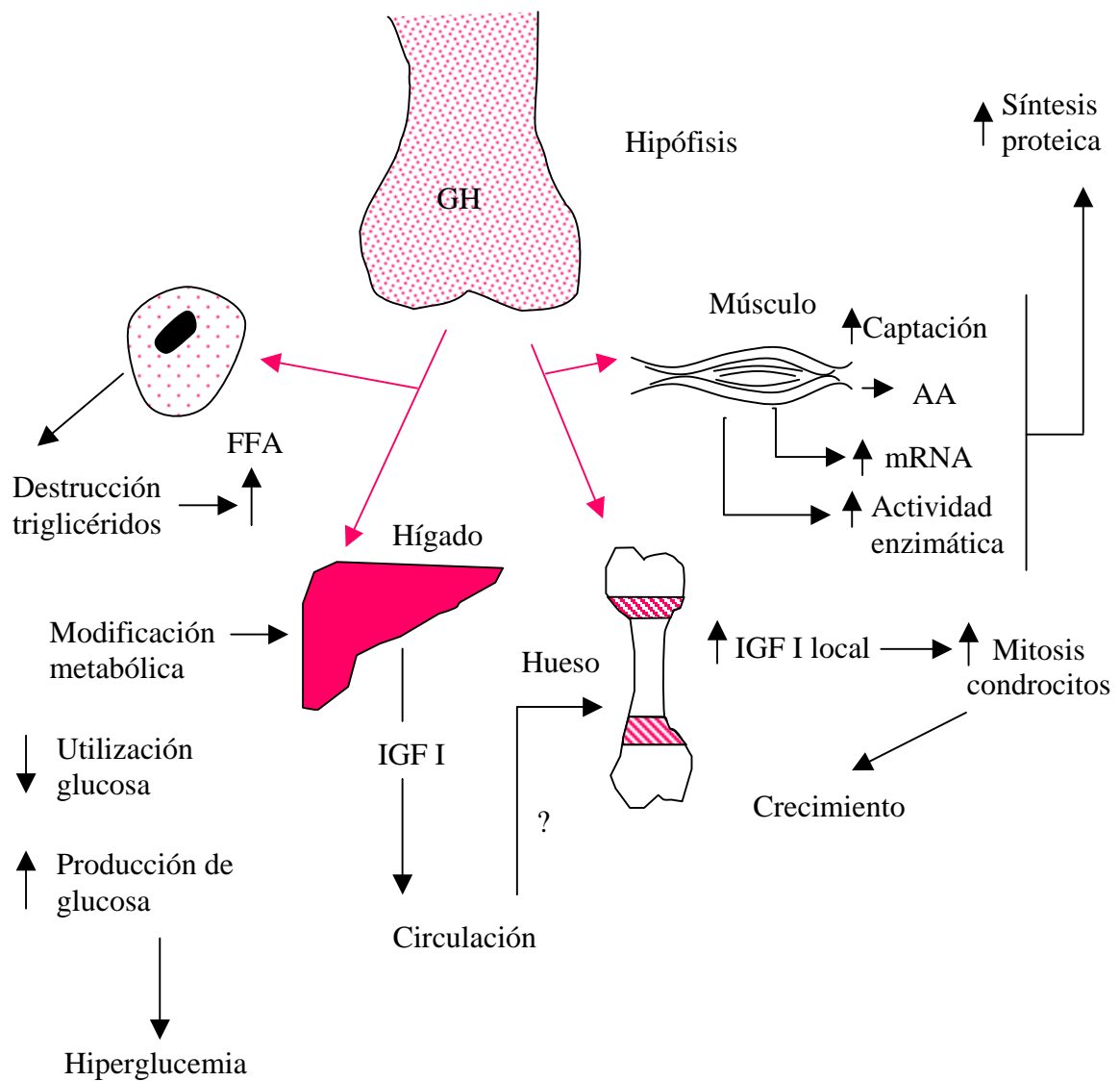


Figura 11. Acciones biológicas de la GH. (Modificado de Devesa *et al.*, 1992)

B. Acciones lipolítica y diabetógena (de GH)

Hace más de 50 años el investigador argentino B. Houssay, Premio Nobel de Fisiología, describió hipersensibilidad a la insulina en animales hipofisectomizados y atribuyó dicho efecto a la ausencia de GH circulante en estos animales. Los efectos de la GH sobre el metabolismo glucídico y el lipídico son aparentemente contradictorios en muchas ocasiones.

La administración de GH a animales hipofisectomizados o niños GH-deficientes, produce una rápida caída de la glucemia, aunque el efecto es de pequeña cuantía y escasa duración. Lo propio ocurre con los niveles de ácidos grasos libres en plasma (FFA) (Fig. 12). Estas acciones tipo insulina de la GH parecen ser debidas al incremento de IGF-I y no parece probable que jueguen un papel fisiológico realmente importante, ya que solamente se manifiestan de forma aguda tras la administración de la hormona de crecimiento a sujetos o animales previamente carentes de ella. En un organismo normal la propia secreción endógena de GH induciría un estado refractario para estos efectos insulínicos.

Por ello, es más importante la acción antiinsulínica de la GH. La administración crónica de GH a animales hipofisectomizados eleva las concentraciones basales de glucosa en plasma, aumentando la producción hepática de este monoglícido. En perros, se ha descrito que el tratamiento con dosis altas de GH puede llevar a la producción de una diabetes permanente. La causa radica, fundamentalmente en que el marcado antagonismo periférico que la GH ejerce sobre la insulina produciría un hiperinsulinismo compensatorio inicial, tras el cual el progresivo agotamiento de la célula beta pancreática llevaría a la alteración metabólica crónica. La secreción fisiológica de GH endógena también produce efectos antiinsulínicos, si bien éstos son de menor cuantía. Asimismo, en la hipersecreción de GH (acromegalia) coexisten intolerancia

hidrocarbonada e hiperinsulinismo, pudiendo llegar a instaurarse una auténtica diabetes.

La GH puede jugar también un papel relevante en la regulación de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, incrementando los segundos y disminuyendo los primeros. Si consideramos que la GH es la hormona responsable del crecimiento, parece lógico el que su acción básica como anabolizante proteico vaya acompañada de un efecto de destrucción de los triglicéridos de reserva y oxidación de los ácidos grasos. De esta forma, se conseguiría la energía necesaria para la fabricación de proteínas y se evitaría la destrucción de estos elementos plásticos (Fig. 12).

C. Acciones sobre el equilibrio electrolítico.

El tejido óseo participa de forma activa en la **homeostasis fosfocálcica**, ya que de los 1000-1200 gramos de calcio que hay en la economía de un humano adulto, aproximadamente el 99% se encuentra en los huesos y el resto está repartido entre el líquido extracelular y el intracelular (Prieto 1992).

Los mecanismos de regulación del calcio actúan a tres niveles: intestino, riñón y hueso. En el hueso está regulado por hormonas que: (a) aumentan la reabsorción ósea, por tanto son hipercalcemiantes (PTH, calcitriol, T₃, GCs), (b) que disminuyen la reabsorción y como consecuencia, disminuyen la calcemia (calcitonina, estrógenos) y (c) hormonas que estimulan la osteogénesis (insulina, progesterona, GH).

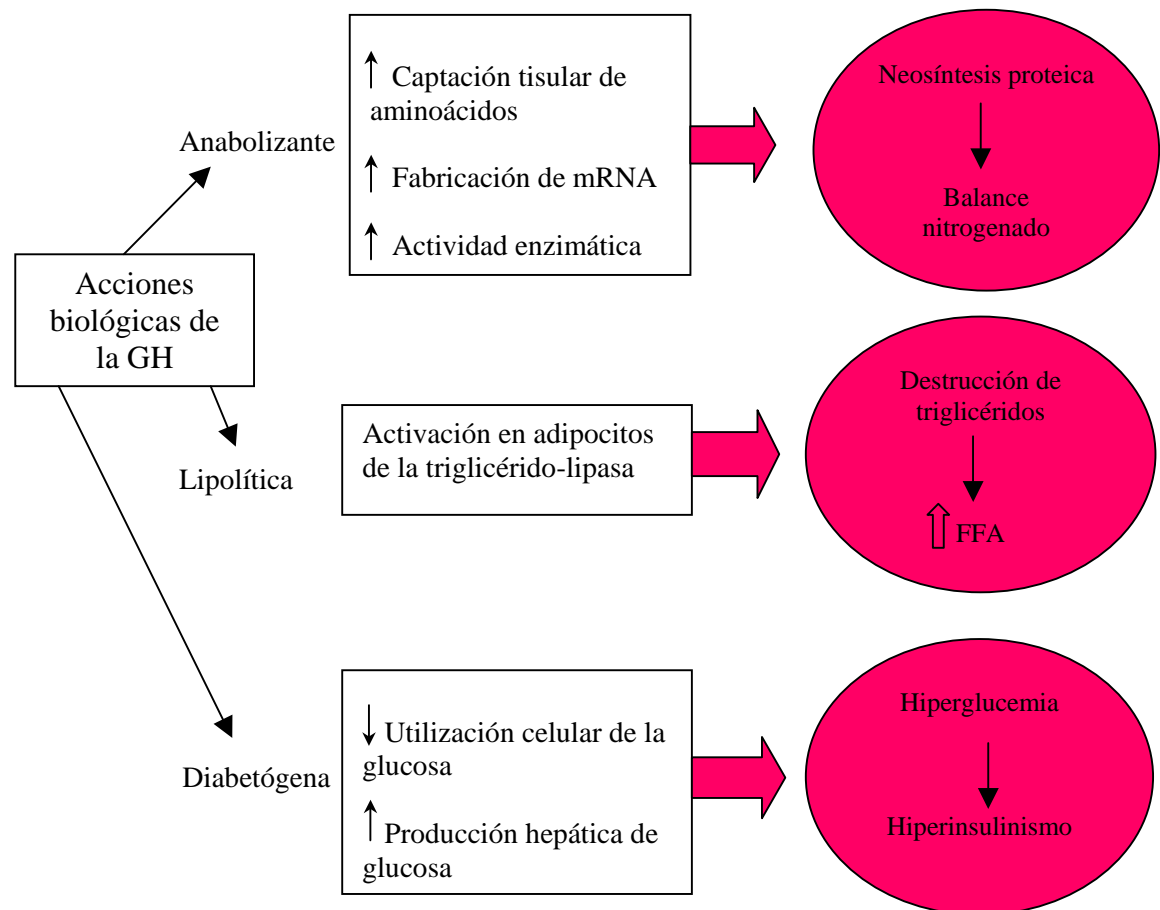


Figura 12. Acciones biológicas de GH a nivel del metabolismo intermediario. (Modificado de Devesa *et al.*, 1992).

Respecto a la GH, se sabe que posee un efecto directo sobre el riñón y el intestino, así como sobre el sistema PTH-vitamina D. Al administrar hormona de crecimiento se produce un aumento en la absorción de calcio en el intestino, disminuyendo su excreción en heces, debido a un aumento del calcitriol (Chipman *et al.*, 1980), por lo que aumenta el calcio sérico (Saggese *et al.*, 1995). En cuanto a la eliminación urinaria de calcio, las acciones de la GH son variables. Se ha visto que tanto en humanos como en animales de experimentación (Marcus *et al.*, 1990; Brixen *et al.*, 1990) la administración de GH induce un aumento de los niveles plasmáticos de calcitriol (1'25 dihidroxivitamina D₃) debido al incremento en la actividad de la 1 α -hidroxilasa renal, mediado por la acción de la IGF-1 (Bouillon, 1991). Como consecuencia de esto, se favorece la absorción intestinal de calcio y fósforo, lo que produce hipercalcemia y aumento de la excreción renal de calcio (Bouillon, 1991). Por el contrario, la administración prolongada de GH, como en los casos de acromegalia, no provoca este aumento en los niveles de calcitriol sérico. La GH también causa el aumento de los niveles séricos de fósforo, ya que hace que aumente la reabsorción tubular en el riñón.

La administración de GH provoca retención de agua y sodio (Jorgensen *et al.*, 1989), es antinatriurética, posiblemente por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Schmid, 1993), y es la causante de los edemas que aparecen al comienzo de las terapias con GH y de la hipertensión en los casos de hipersecreción de la hormona. Si bien, en sujetos con déficit de GH también se observa un aumento en la prevalencia de hipertensión (Rosen *et al.*, 1993 a).

También se ha descrito una retención de potasio en proporción directa a la de sodio (Gibney *et al.*, 1999).

3.3.2.2. Otras acciones de la GH

Además de las acciones descritas sobre el metabolismo intermediario, la GH es mediadora de la **respuesta inmune**, aumentando la actividad de las células *natural killer* (Iglesias y Díez, 1996) e incrementado la capacidad inmunitaria (Taub *et al.*, 1994).

En cuanto a la **proliferación celular**, la hormona del crecimiento es fuertemente mitogénica en las células hematopoyéticas (Isaksson *et al.*, 1988) y estimula el crecimiento incrementando la supervivencia celular por su acción antiapoptótica (Costoya *et al.*, 1999, 2000). Puesto que juega un papel relevante en la multiplicación y crecimiento celular, se ha utilizado terapéuticamente para acelerar la cicatrización de heridas en unidades de quemados (Klein *et al.*, 1998), incluso con aplicaciones tópicas en úlceras tórpidas en enfermos diabéticos (Benito y Corpas, 1991).

Tras la descripción del síndrome asociado a la deficiencia de GH (GHD), se sospechó que los pacientes con este diagnóstico presentaban un aumento en la incidencia de enfermedades **cardiovasculares** con una tasa de mortalidad cardiovascular mucho mayor de lo esperado (Rosen y Benstsson, 1990). Tras el tratamiento con GH se observó una clara disminución de los niveles de colesterol total plasmático, siendo la GH uno de los mediadores más importantes en la expresión de los receptores de las lipoproteínas LDL, pero el mecanismo por el cual actúa no se conoce con exactitud (Rudling *et al.*, 1992). La GH (vía IGF-I) (Beshyah *et al.*, 1994), aumenta la masa del ventrículo izquierdo y mejora la función cardíaca y el rendimiento cardiovascular (Koea *et al.*, 1996). Asimismo, provoca hipertrofia del miocardio y aumento de la contractibilidad cardíaca (Cuneo *et al.*, 1991).

La GH juega un papel determinante en la **composición corporal**, aumentando la masa y la fuerza muscular (Johansson *et al.*, 1997; Gibney *et al.*, 1999), disminuyendo el

tejido adiposo (Jorgensen *et al.*, 1989; Salomon *et al.*, 1989) y produciendo un incremento de la capacidad de realizar ejercicio físico. Tiene una acción lipolítica, reduciendo principalmente los depósitos de grasa visceral, más que el tejido celular subcutáneo (Bengtsson *et al.*, 1993; 1998).

En enfermos de EPOC la administración de 0.05 mg/kg de peso de rhGH mejoró significativamente el balance nitrogenado y se consiguió ganancia de peso y **aumento significativo de la presión inspiratoria** (Pape *et al.*, 1991), así como de la masa corporal (Burdet *et al.*, 1997). La administración de grelina, un péptido liberador de la hormona del crecimiento, tiene efectos anticaquéticos (Nagaya *et al.*, 2006)

La terapia con GH **favorece el balance nitrogenado positivo** en todas aquellas situaciones de catabolismo aumentado (grandes quemados, traumatismos severos, sepsis, pacientes en hemodiálisis, tras una intervención quirúrgica, etc.) (Iglesias y Díez, 1996; Kopple *et al.*, 2005), pero según un reciente estudio, este efecto es sólo beneficioso a corto plazo en enfermos críticos, por lo que habrá que esperar a que aparezcan más trabajos al respecto para contrastar opiniones (Teng Chung y Hinds, 2006).

Los cambios fisiológicos que acontecen en el cuerpo humano durante el **envejecimiento** son similares a los que se observan en la GHD. Se produce un aumento de la grasa corporal y del riesgo cardiovascular, una disminución de la masa y la fuerza muscular, la reducción de la resistencia en el ejercicio, el adelgazamiento de la piel y el empeoramiento de la calidad de vida. Estas observaciones llevaron a plantear que el envejecimiento era un déficit de GH (somatopausia) (Sherlock y Toogood, 2007) y que la terapia con la hormona mejoraría la situación. Parece que el patrón endocrino del envejecimiento es distinto de la disminución de niveles de GH/IGF-I asociada al hipopituitarismo, sin embargo, puesto que la GH juega un papel importante en el metabolismo y en la fisiología ósea, se ha utilizado en ancianos con malnutrición con muy

buenos resultados (Chu *et al.*, 2001). En ratas ancianas, el tratamiento con GH ha conseguido mejorar la función y morfología vasculares y mostrar efectos beneficiosos sobre la composición corporal (Castillo *et al.*, 2005).

El tratamiento combinado con GH, melatonina, estrógenos y fitosoja parece tener efectos beneficiosos frente a los daños producidos por la edad en SNC, hígado y piel, reduciendo el estrés oxidativo y la apoptosis (Fernández-Tresguerres, 2006).

El eje GH/IGF-I está implicado en la regulación del crecimiento, el desarrollo y la mielinización **cerebrales**. Ambas hormonas tienen efectos sobre los astrocitos, las neuronas y los oligodendrocitos, en concreto, el IGF-I incrementa la proliferación de células progenitoras y de nuevas neuronas, oligodendrocitos y vasos sanguíneos en el *gyrus dentado* del hipocampo (Aberg *et al.*, 2006).

Se sabe que la GH aumenta el número de neurotransmisores en ratas viejas, igualándolas a las jóvenes y aumenta de forma significativa la población neuronal en el hipocampo (Ariznavarreta *et al.*, 2003). Las alteraciones producidas en la señal del eje GH/IGF-I pueden aumentar la esperanza de vida en estos animales (Selman *et al.*, 2007).

Recientemente, se ha publicado un estudio sobre ratones transgénicos con una sobreexpresión de GH bovina en los que se ha apreciado que esta sobreexpresión produce obesidad inducida por hiperfagia, lo que indicaría que la hormona del crecimiento tiene un efecto dual: produciendo por un lado la estimulación a nivel central del apetito y generando, por otro, un efecto lipolítico periférico (Bohlooly *et al.*, 2005).

3.3.3. ACCIONES DE LA GH SOBRE EL HUESO

3.3.3.1. *Efectos de la GH sobre el crecimiento longitudinal óseo*

A. **La GH y la regulación del crecimiento óseo longitudinal postnatal**

Durante el proceso de crecimiento longitudinal del hueso, los precondrocitos de la capa celular germinal se diferencian y después sufren una expansión clonal limitada en columnas de condrocitos, en la placa de crecimiento. Como consecuencia de esto, las células de la zona hipertrófica maduran y degeneran, siendo incorporadas al hueso (Isaksson *et al.* 1987).

La GH es la hormona más importante en el crecimiento longitudinal óseo postnatal. Es más, se ha demostrado que la GH estimula el crecimiento del cartílago y otros tejidos más que por el aumento de tamaño de las células, por el incremento del número de éstas (Kember y Walker, 1971).

Según la hipótesis inicial, la GH inducía el crecimiento óseo mediante la estimulación hepática de IGF-I (también llamado factor de sulfatación) y este factor era el que en definitiva estimulaba el crecimiento longitudinal del hueso de forma endocrina (Daughaday y Rotwein, 1989). Pero al comienzo de los ochenta, esta hipótesis cambió gracias a un estudio llevado a cabo en ratas a las que se les inyectó GH directamente en la tibia, comprobándose que esta hormona estimulaba el crecimiento longitudinal de la placa de crecimiento en el lugar de la inyección (Isaksson *et al.*, 1982). Esta observación inicial se ha confirmado y extendido posteriormente, y actualmente está perfectamente documentado que la GH estimula directamente el crecimiento de muchos tejidos (Kassem *et al.*, 1993; Russell y Spencer 1985; Barnard *et al.*, 1991; Isgard *et al.*, 1986; Lewison *et al.*, 1993; Maor *et al.*, 1989, Stracke *et al.*, 1984).

Al estudiar los efectos de GH e IGF-I en preadipocitos 3T3, Green y colaboradores (1985) descubrieron que GH e IGF-I actuaban en diferentes estadios de maduración; la GH estimulaba los preadipocitos jóvenes, mientras que el IGF-I estimulaba células en un estadio de desarrollo posterior. A este efecto lo llamaron “teoría del efector dual” (*dual effector theory*). En consecuencia, los investigadores pensaron que esta teoría también podría aplicarse al tejido óseo (Isaksson *et al*, 1987). Se llevaron a cabo una serie de estudios *in vitro* usando cultivos de condrocitos de epífisis, y se observó que la GH estimulaba la formación de colonias de precondrocitos, mientras que IGF-I estimulaba células en un estado de maduración más avanzado y la GH interactuaba con las células progenitoras de los osteoblastos (Kassem *et al*, 1994).

B. Papel fisiológico del IGF-I en el crecimiento óseo.

Los estudios desarrollados en los últimos 30 años en animales y hombres GH-deficientes relacionados con la administración sistémica de IGF-I demuestran la capacidad de IGF-I y GH para estimular el crecimiento longitudinal óseo *in vivo* (Doga *et al.*, 2005; Gibney *et al.*, 1999; Johannsson *et al.*, 1997; Degerblad *et al.*, 1995; Sarnat H *et al*, 1988; Guler *et al.*, 1988; Holder *et al.*, 1981), así como el papel crítico que juegan el IGF-I y su receptor, en el correcto desarrollo normal del crecimiento y de los tejidos. La administración sistémica de IGF-I recombinante estimula tanto el crecimiento longitudinal óseo como la ganancia de peso en ratas hipofisectomizadas (Kidder *et al*, 1997; Guler *et al.*, 1988; Russell y Spencer, 1985; Holder *et al.*, 1981). Todos estos datos muestran que la liberación sistémica de IGF-I tiene la capacidad de incrementar el crecimiento en animales.

C. Evaluación de la Teoría de la somatomedina vs. la Teoría del efector dual

La administración sistémica de GH e IGF a ratas hipofisectomizadas ha demostrado que estas dos hormonas tienen funciones independientes y diferentes (Holder *et al.*, 1981; Fielder *et al.*, 1996). Cuando se suministran a la vez, sus efectos son sinérgicos; sin embargo, la sobre-expresión de GH (pero no la de IGF-I) produce crecimiento supranormal en ratones transgénicos (Behringer *et al.*, 1990). Por otro lado, la administración local de GH (pero no de IGF-I) produce un aumento de la producción local de IGF mediante la estimulación de la transcripción del gen de IGF-I (Isgaard *et al.*, 1986). Por tanto, se observa que hay una interrelación entre ambos factores.

Al administrar anticuerpos anti-IGF-I, se inhibe el efecto estimulador de la GH que ha sido aplicada de forma local, apoyando la teoría de que el IGF-I producido localmente tiene un papel muy importante en la expresión del efecto de la GH en el tejido de aplicación (Isaksson *et al.*, 1987).

El tratamiento con IGF-I es muy efectivo en el síndrome de insensibilidad a GH (GHIS) para aumentar el crecimiento en estatura durante 1 ó 2 años (apoyando así la teoría de la somatomedina), pero el efecto va disminuyendo, quizá debido a una tasa menor de estimulación de precondrocitos por un déficit de IGFBP-3 inducida por GH y/o por una administración de IGF-I sub-óptima (Backeljauw y Underwood, 2001; 1996).

La cuestión de si el IGF-I autocrino/paracrino o endocrino es el factor más importante en la estimulación del crecimiento tisular no se podrá resolver probablemente hasta que se puedan desarrollar estudios en animales transgénicos con delecciones génicas específicas para IGF-I o para su receptor.

Con los datos disponibles podemos afirmar que la GH estimula el crecimiento longitudinal de forma directa mediante la estimulación de los precondrocitos en la placa de crecimiento, seguido de una expansión clonal causada tanto por la producción local de

IGF-I inducido por GH, como por el aumento en los niveles circulantes de IGF inducidos por GH. La GH es el determinante más importante para producir la estimulación de las células progenitoras, aunque es posible que IGF-I pueda estimular de alguna manera también la célula progenitora.

3.3.3.2. *Efectos de GH in vitro*

Los **cultivos de tejido óseo**, si los comparamos con los sistemas de células aisladas, ofrecen la ventaja de que preservan las interacciones intercelulares, por tanto, se presenta un experimento más parecido a una situación *in vivo*.

La aplicación de GH a distintos cultivos de tejido óseo *in vitro*, ha demostrado que la hormona del crecimiento:

- Induce directamente la formación de hueso (Maor *et al.*, 1989),
- Estimula la producción de IGF-I (Maor *et al.*, 1989),
- Incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina (Stracke *et al.*, 1984),
- Eleva la síntesis de DNA (Maor *et al.*, 1989), y
- Aumenta el tamaño del cartílago (Maor *et al.*, 1989).

La GH estimula la proliferación de los **osteoblastos** (Kassem *et al.*, 1993, 1994; Kassem 1997; Sliotweg *et al.*, 1988, 1997) y a veces las funciones diferenciales de estas células, tales como la fosfatasa alcalina, osteocalcina, y el colágeno tipo I. Interactúa con las células progenitoras, al igual que ocurre en el caso de los progenitores de células de tejido adiposo y cartílago (Kassem *et al.*, 1994). La GH induce la expresión de IGF-I (efecto anabólico) en osteoblastos de roedores (Canalis *et al.*, 1989; Mohan y Baylink, 1991), pero no está clara esta inducción en los osteoblastos humanos (Chenu *et al.*, 1990; Kassem *et al.*, 1993).

Se sabe que el tratamiento con GH eleva los niveles séricos de IGFBP-3 (Holloway *et al.*, 1994) y aumenta la producción de IGFBP-3 en osteoblastos de rata (Ernst y Rodan,

1990; McCarthy *et al.*, 1994), pero no en los humanos (Canalis *et al.*, 1989); disminuye la producción de IGFBP-4 en osteoblastos tanto humanos como de rata (Mohan *et al.*, 1995) y aumenta los niveles de IGFBP-5 mRNA en los osteoblastos primarios de rata (McCarthy *et al.*, 1994). Parece que algunos de los efectos de GH sobre los osteoblastos están mediados por IGF, pero otros no.

Efectos de la GH sobre los osteoclastos

Se sabe que la GH eleva el número de osteoclastos en el hueso metafisario de tibia de rata hipofisectomizada (Lewinson *et al.*, 1993) que estimula la reabsorción ósea osteoclástica a través de la acción directa e indirecta sobre la diferenciación osteoclástica, y de forma indirecta sobre la activación de los osteoclastos maduros (Nishiyama *et al.*, 1996) y vía IGF-I e IL-6, sobre la formación osteoclástica (Stracke *et al.*, 1984; Nishiyama *et al.*, 1996; Saggese *et al.*, 1995, Mochizuki *et al.*, 1992, Jilka *et al.*, 1992).

3.3.3.3. Efectos de la GH sobre el metabolismo óseo en animales

Los modelos animales *in vivo* son útiles para evaluar la influencia del tratamiento con GH sobre los cambios en la masa, el metabolismo óseo y la resistencia mecánica del hueso. Estos modelos son excelentes para el estudio histológico ya que es posible realizar la histomorfometría estática y dinámica, así como evaluar diferencias en la respuesta de distintas zonas o regiones.

La administración sistémica de GH incrementa los niveles circulantes de otras hormonas que tienen influencia sobre el hueso, tales como el IGF-I y el metabolito activo de la vitamina D: 1,25-(OH)₂D₃ (Goff *et al.*, 1990). Hasta ahora, la administración sistémica de GH se ha utilizado en casi todos los modelos experimentales, y ha sido imposible dilucidar si las diferencias encontradas en las medidas están causadas por la

estimulación local o sistémica (vía IGF-I circulante) de la GH. Se han detectado receptores de GH, GHRs, en osteoblastos de epífisis de fémur y en calota de rata, utilizando técnicas inmunorreactivas y de mRNA (Morel *et al.*, 1993). Se ha estudiado el efecto de la liberación local de GH sobre el hueso en ratas, y se han demostrado los efectos de la expresión local de GH en tejido óseo en ratones transgénicos para GH. Varios estudios *in vivo* han mostrado que la GH es capaz de estimular la formación ósea mediante la interacción directa con el hueso (Hedner *et al.*, 1996; Saban *et al.*, 1996).

A. Efectos de la diferenciación y del tratamiento con GH sobre el hueso.

En ratas enanas (*dwarf*) dw/dw, que presentaban una función pituitaria normal exceptuando una deficiencia de GH, se encontró una disminución en la densidad DMO y un aumento en la AP sérica (Wright *et al.*, 1995b), así como un aumento en la formación de hueso perióstico, un incremento en la deposición de colágeno y una ligera disminución de la DMO (Martínez *et al.*, 1996).

En general, la administración de GH aumenta la formación y la masa ósea en animales con GHD.

B. Efectos del tratamiento con GH en los parámetros óseos de animales con secreción normal de GH.

Las ratas normales se han utilizado en muchas ocasiones para estudiar la influencia de la GH sobre el hueso intacto y los experimentos se han desarrollado en ratas jóvenes, adultas y viejas. Sin embargo, en casi todos estos estudios, la administración de GH ha provocado un crecimiento óseo lineal, porque las placas de crecimiento no se cierran hasta que las ratas son muy viejas. Por tanto, los datos obtenidos hay que evaluarlos en relación con el crecimiento, con el modelado y el remodelado óseos. Estos patrones de respuesta en

ratas deberían compararse con la situación obtenida en los primates (monos, humanos), ya que en éstos, las placas de crecimiento se cierran tras la maduración sexual.

En **ratas** se incrementa la masa ósea cortical mediante la inducción de la formación ósea subperióstica y se produce un incremento de la resistencia mecánica de todo el hueso (Jorgensen *et al*, 1991; Andreassen *et al*, 1995); ganan peso y se evidencia un aumento del *turn over* óseo (Turner, 1995).

En los **ratones gigantes GH-transgénicos** donde el promotor era la osteocalcina, la GH se expresaba en los osteoblastos, y se demostró mayor crecimiento en el fémur, aumento del grosor o anchura cortical y un incremento de la fuerza mecánica (Tseng *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1992), pero la calidad de hueso había disminuido.

El metabolismo de los **primates** es más parecido al humano, por eso se han utilizado en diversos trabajos. En monas viejas se demostró que la administración de GH incrementaba la formación ósea medida por el depósito mineral y las tasas de formación ósea en huesos (Sass *et al.*, 1997).

La terapia con GH en **animales ovariectomizados (OVX)** estimula la masa cortical ósea induciendo la formación de hueso subperióstico, produciéndose un incremento del volumen óseo, del ratio superficie/volumen y de las superficies de mineralización osteoide y de osteoclastos (Andreassen y Oxlund, 1996). Además se eleva la fuerza o resistencia mecánica de los cuerpos vertebrales directamente relacionada con el aumento de masa ósea (Andreassen y Oxlund, 1996; Eschen y Anddreassen, 1995).

En **animales tratados con glucocorticoides**, los tratamientos a largo plazo con GH no parecen contrarrestar el efecto adverso de los glucocorticoides sobre el crecimiento

lineal, la formación de hueso y la masa ósea, aunque la GH por sí sola puede elevar estos parámetros (Ortoft y Oxlund, 1996).

C. Efectos de la GH en la curación de fracturas

Obviamente, la terapia con GH en ratas (Bak *et al.*, 1990; Bak y Andreassen, 1991; Nielsen *et al.*, 1991) y en *minipigs* (Kolbeck *et al.*, 2003; Bail *et al.*, 2002) favorece la formación del callo óseo y la resistencia mecánica de los huesos en proceso de curación, mientras que en conejos (Brittberg *et al.*, 1997), la respuesta es mucho más débil.

3.3.3.4. Efectos de la GH en el metabolismo óseo en humanos

A. En pacientes con exceso o déficit de GH

La **acromegalia** es una rara enfermedad que está causada por una hipersecreción de GH y está fuertemente asociada con un aumento del *turn over* óseo en las etapas de actividad. Muchos estudios sugieren que el hueso cortical está aumentado en la acromegalia mientras que el trabecular no parece estar tan afectado (Bolanowski *et al.*, 2006; Bogazzi *et al.*, 2005; Slootweg 1993).

En **niños con deficiencia de GH**, se encuentra una osteopenia relativa antes de comenzar el tratamiento con GH, seguramente producida por un retraso en la maduración esquelética (Ono *et al.*, 1996; Kaufman *et al.*, 1992). Diversos trabajos han mostrado que en adultos con GHD de comienzo infantil, existe baja masa ósea (Van de Weghe *et al.*, 1993; Bravenboer *et al.*, 1997; Kaufman *et al.*, 1992) así como una disminución en el CMO y en el área de densidad mineral ósea (CMO/ área ósea), en la espina dorsal y en la cadera no dominante. También se ha observado una relación positiva entre la altura y el área de DMO. Resultados similares se han obtenido en pacientes con deficiencias

pituitarias múltiples y GHD aislada, lo que sugiere que la falta de GH es el factor más importante en la baja masa ósea observada en la GHD establecida en la infancia (Kaufman *et al.*, 1992).

No hay datos que sugieran que se produce un aumento de pérdida de hueso tras cesar el tratamiento con GH en adultos jóvenes (Kaufman *et al.*, 1992). Por eso, se podría pensar que el no adquirir la suficiente masa ósea durante la infancia, y en consecuencia, tener un pico menor de la misma, explicaría la disminución en CMO y DMO en estos pacientes. Por el momento, no hay trabajos que muestren que el tratamiento con GH durante la infancia dé como resultado la normalización en el DMO cuando se alcanza el pico óseo, sugiriendo que la GH también es importante en el incremento de hueso adicional que sucede tras completar el crecimiento lineal. El tratamiento con la hormona debería continuarse hasta alcanzar el pico de masa ósea, sin tener en cuenta la altura alcanzada.

En diversos trabajos se ha encontrado un aumento de la prevalencia de osteoporosis en **pacientes con GHD adquirida en la edad adulta** (Johansson *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1993; Degerblad *et al.*, 1995). La densidad mineral ósea total medida mediante DEXA disminuye (Johansson *et al.*, 1992), así como el CMO (Rosen *et al.*, 1993), éste último en pacientes menores de 55 años. Es interesante el hecho de que los adultos viejos tienen menor disminución de masa ósea que los adultos jóvenes.

Se sugiere la existencia de **mayor riesgo de fractura** vertebral osteoporótica en pacientes con hipopituitarismo. Rosen *et al.* (1993, 1997) encontraron una tasa de 2 a 3 veces superior en pacientes con GHD comparado con los controles sanos, (una submuestra del estudio WHO MONICA de Goteborg).

Durante el **tratamiento con GH de las personas que padecen GHD** se produce un incremento dosis dependiente de los marcadores de reabsorción y formación óseos, que es máximo tras 3 y 6 meses respectivamente (Hansen *et al.*, 1996; Johannsson *et al.*, 1996 b). Tras dos años de tratamiento, la tasa elevada de remodelado óseo se mantiene (Johannsson *et al.*, 1996 b). En un trabajo realizado sobre varones con GHD (Bravenboer *et al.*, 1997) se hizo evidente un aumento del *turn over* óseo y un incremento del espesor cortical. El *turn over* óseo puede permanecer elevado durante muchos años como resultado de la presencia de altos niveles de GH en plasma (Kotzmann *et al.*, 1993). La GH debe elevar la actividad de la 1 α -hidroxilasa, elevando por tanto la concentración o la disponibilidad (Lieberman *et al.*, 1994) de la vitamina D₃, lo que, posiblemente, se convierte en el mecanismo por el que se produce el incremento sostenido de las concentraciones cálcicas. Una hipótesis alternativa sería que se produce una mayor movilización del calcio esquelético debido al aumento del *turn over* óseo.

En los tratamientos a corto plazo (6-18 meses) en niños con GHD, no se observa un aumento significativo de DMO ni de CMO (Whitehead *et al.*, 1992; Balducci *et al.*, 1995), incluso se aprecia disminución marcada de estos parámetros (Thoren *et al.*, 1993). Por el contrario, en los experimentos a largo plazo (12-30 meses), los resultados son más esperanzadores (O'Halloran *et al.*, 1993; Degerblad *et al.*, 1992). En la GHD establecida en la edad adulta, los resultados a corto plazo son similares (Beshyah *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1995; Degerblad *et al.*, 1995) y a largo plazo se observa un incremento significativo de DMO en espina lumbar y cuello femoral (Baum *et al.*, 1996).

Puesto que la absorciometría ósea sólo detecta el componente mineral del hueso, la reducción en la densidad observada tras periodos cortos de tratamiento con la hormona se puede explicar por el aumento de la actividad remodeladora, donde se produce mayor

espacio de remodelación y un aumento de proporción del hueso nuevo sin mineralizar (Johannsson *et al.*, 1996b).

También se han observado diferencias en la respuesta de los distintos sexos a los tratamientos con GH, de tal forma que la interacción entre GH y estrógenos induce un balance de remodelado más positivo y con menor incremento en la actividad remodeladora ósea comparada con la interacción entre GH y andrógenos (Johannsson *et al.*, 1996 b).

Efectos de la GH sobre la vejez : Los artículos publicados no han mostrado un efecto muy marcado de la GH sobre la masa ósea (Rudman *et al.*, 1990; Holloway *et al.*, 1994; Marcus *et al.*, 1990), sin embargo y puesto que el efecto positivo de esta hormona sobre la masa ósea en pacientes con GHD no se hace evidente hasta los 18 meses de tratamiento, serían necesarios más trabajos para conocer exactamente si la terapia es efectiva o no sobre la masa ósea de los pacientes mayores antes de llegar a establecer conclusiones.

B. Efectos del eje GH/IGF-I en el metabolismo óseo y en la masa ósea en pacientes con secreción normal de GH

B1 Osteoporosis

Las causas de la osteoporosis son complejas y multifactoriales. La masa ósea disminuye con la edad, pero los mecanismos por los que se produce todavía no se han esclarecido completamente. El aumento de edad está asociado con una disminución de la secreción de GH y de la concentración sérica de IGF-I (Brixen *et al.*, 1993; Jeffcoat *et al.*, 1993). Estos resultados indican que el eje GH/IGF-I también puede estar implicado en la patofisiología de la osteoporosis postmenopáusica y se debería tener en cuenta en el tratamiento de estos pacientes.

Por otro lado, la terapia a largo plazo con GH en el sd. de Turner resulta en un estado mineral óseo normal (Lanes *et al.*, 1995).

B2 Osteoporosis inducida por corticoides

Esta dolencia se caracteriza por una disminución de la formación ósea junto con un incremento en la reabsorción. El tratamiento con GH durante 7 días en pacientes con consumo crónico de glucocorticoides resulta en un aumento significativo de las concentraciones séricas de osteocalcina, PICP y CITP (Giustina *et al.*, 1995), pero son necesarios más estudios a largo plazo.

B3 Efecto de IGF-I

Se ha observado que bajas dosis de IGF-I son capaces de estimular de forma independiente la formación ósea sin inducir reabsorción (Ghiron *et al.*, 1995). Al comparar los efectos terapéuticos de GH e IGF-I se observó que los resultados eran muy similares, aunque el PICP se elevaba más con IGF-I (Johansson *et al.*, 1996 a). Estos datos sugieren un nuevo uso del IGF-I para estimular de forma selectiva la formación en estados de desnutrición y bajo *turn over* óseo, pero no está claro si IGF-I tiene también la capacidad de incrementar la masa ósea en humanos.

C. Curación de fracturas

El tratamiento con GH acelera la curación de las fracturas cerradas de forma estadísticamente significativa (frente a placebo), reduciendo el tiempo de curación aproximadamente un 26 %, sin embargo, no existen diferencias significativas cuando se trata de fracturas abiertas y cerradas tomadas en conjunto (Raschke *et al.*, 2007). Por otro lado, puesto que el eje GH/IGF-I tiene efectos muy marcados sobre la regulación local y

sistémica del metabolismo óseo, puede ser muy importante en la calidad del proceso de curación de las fracturas, de hecho, una alteración en este eje puede estar implicada en los mecanismo bioquímicos que determinan el retraso o el fracaso de la curación de fracturas (Weiss *et al.*, 2007).

Por el momento, no es posible evaluar si el tiene alguna relevancia en la curación de fracturas en humanos ya que se han llevado a cabo muy pocos experimentos.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1. MATERIAL

4.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

4.1.1.1. *Fase de osteoporosis experimental*

Se utilizaron veinticinco conejas sanas pertenecientes a la raza *New Zealand White*, con un peso entre 4 y 4,5 kg. A lo largo del proceso experimental, los animales permanecieron en celdas individuales y en un ambiente estable de 22- 24°C, humedad del 55-70%, ventilación de 15 renovaciones por hora y un ritmo de luz circadiano de 12 horas. Antes de la ovariectomía, los animales fueron alimentados con la dieta estándar de laboratorio (Panlab SL), y tras la ovariectomía se les suministró una dieta pobre en calcio (Nutrient Requirements of Rabbits, 1997) (Tabla XII); recibieron agua *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité Local de Ética para el Uso de Animales de la UCM.

4.1.1.2. *Fase de colocación de implantes y aplicación de GH*

Para este trabajo, se utilizaron dieciséis conejas sanas de la raza *New Zealand White*, con pesos comprendidos entre los 4 y los 5kg. Las condiciones de estabulación fueron las mismas que las mencionadas en el apartado anterior. El grupo control (NO-OVX) fue alimentado con la dieta estándar de laboratorio (Panlab SL) y al grupo de conejas ovariectomizadas (OVX) se les suministró una dieta pobre en calcio (Nutrient Requirements of Rabbits, 1997) (Tabla XII); ambos grupos recibieron agua *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité Local de Ética para el Uso de Animales de la UCM.

4.1.2. MATERIAL QUIRÚRGICO

Se utilizó el instrumental propio de las intervenciones quirúrgicas e implantológicas, así como ketamina (Imalgene 1000®) y xilacina (Rompún 2%®) como material de anestesia.

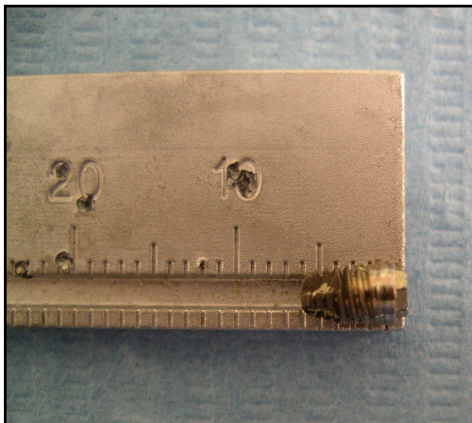
4.1.3. MATERIAL PARA LA DENSITOMETRÍA

Se utilizó el densitómetro NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) (Fig. 8) en el modo investigación. Las imágenes obtenidas se almacenaron en un ordenador personal y se procesaron mediante el *software* que acompaña al densitómetro.

4.1.4. MATERIAL DE EXPERIMENTACIÓN

4.1.4.1. *Implantes*

Se colocaron implantes roscados de titanio puro con superficie tratada de la casa B&W ®, de 6 mm de longitud, con 2'5 mm de diámetro en la rosca y 3'3 mm de diámetro en la cabeza del implante, con hexágono externo (Figs. 13 y 14).



Figuras 13. Implante utilizado en el estudio.



Fig 14. Implante B&W

4.1.4.2. *Hormona del crecimiento*

Se utilizó hormona del crecimiento recombinante humana liofilizada-particulada (Saizen ®, Laboratorios Serono, Madrid, España), 2 U.I. por cada lecho implantario.

4.1.5. MATERIAL HISTOLÓGICO

Se diseccionaron las tibias y se sumergieron en una solución tamponada a pH 7 de formaldehído al 10%. Se eligió la parte proximal de las tibias, donde estaba situado el implante, para incluir estas muestras en metacrilato (GMA y T-7200®), en concentraciones crecientes y durante 2 meses, con el fin de que toda la muestra se incluyera correctamente en esta sustancia. Posteriormente se polimerizaron durante 8 horas (dos horas en luz blanca y seis en luz azul) con una lámpara de luz ultravioleta Exakt® hasta conseguir un bloque homogéneo (Fig. 15).

Cada bloque de metacrilato fue montado y cortado sucesivamente con el microtomo Exakt® y pulido con la pulidora Exakt® hasta conseguir cinco o seis preparaciones de cada espécimen de aproximadamente 70μ, susceptibles de ser teñidas, con tricrómico de Masson, Sirius, Azul Alcían, Azul de Toluidina, y Hematoxilina Weigert - Eosina,

siguiendo el protocolo del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid). Las preparaciones se analizaron mediante microscopio óptico.

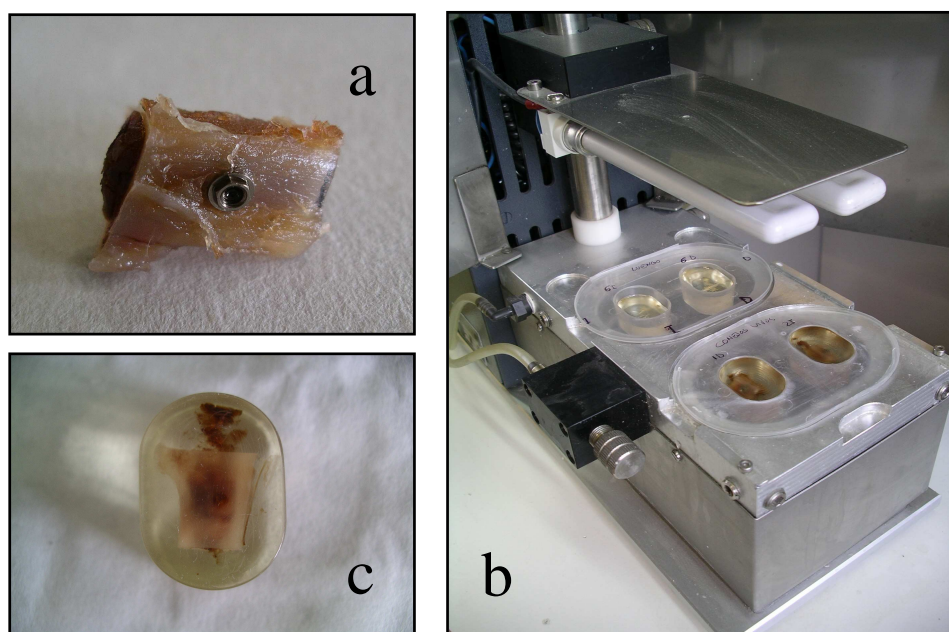


Figura 15. (a) Porción proximal de tibia donde se aloja el implante, (b) lámpara de polimerización Exakt ®, (c) bloque de metacrilato polimerizado.

4.2. *METODOLOGÍA*

4.2.1. METODOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL

En este estudio, la osteoporosis experimental en conejas se pretende conseguir mediante la ovariectomía más administración de dieta hipocálcica. Para evaluar la efectividad del método, se realizaron mediciones de DMO (densitometrías) *in vivo* antes y después de la ovariectomía y la dieta hipocálcica.

4.2.1.1. *Animales de experimentación*

Para la realización de la densitometría, las 25 conejas se anestesiaron mediante una inyección de 0'75 mg/kg de ketamina intramuscular (Imalgene 1000®) más 0'25 mg/kg de xylazine (Rompún 2%®) (Weisbroth and Fudens, 1972; Green y *et al*, 1981).

4.2.1.2. *Medición de la densidad mineral ósea mediante el análisis con absorciometría dual fotónica (DEXA).*

El análisis DEXA se llevó a cabo en un densitómetro NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) en el modo investigación en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid). Para determinar el coeficiente de variación intrínseco del aparato, se escaneó diariamente un fantomas de columna diseñado específicamente para la máquina, previo a las densitometrías (Fig. 8).

Todas las conejas se colocaron centradas sobre la superficie de la camilla en la misma posición (decúbito prono), sobre un plástico primero y un papel secante de laboratorio en segundo lugar. Asimismo, se les cubrió la cabeza con un paño quirúrgico. Las extremidades se colocaron perfectamente estiradas y las orejas se fijaron a la mesa con cinta adhesiva a ambos lados de la calota (con el fin de no interferir con la medición de la densidad de la columna).

Mediante la opción de investigación que nos ofrece el *software* del densitómetro, se realizaron, en primer lugar, el estudio de la calota y la columna cervical. Se predeterminaron las zonas a explorar mediante un indicador de rayo láser rojo, marcando un primer punto de inicio en el hocico, un segundo o punto final a unos centímetros tras la salida de las patas delanteras y un 3^{er} punto base lateralmente al cuello y ventral a la salida de la pata delantera derecha. Se completó el estudio en un tiempo aproximado de 15 minutos.

Para el estudio de la tibia trasera derecha se colocó la extremidad perfectamente alineada con el eje longitudinal de la mesa. Las marcas de referencia fueron: la primera, a unos centímetros craneal a la articulación de la rodilla, un 2º punto distal al tobillo y un tercero base, lateral (por fuera y a la derecha) al punto medio de la longitud de la tibia. Este estudio se completó en un tiempo aproximado de 8 minutos.

Para todas las exploraciones y una vez marcados los puntos de referencia para definir la zona, se modificaron los parámetros prefijados por el densitómetro y se adaptaron para la opción de investigación, esto es: resolución de exploración y de medida: 1.0 x 1.0 y velocidad de exploración de 40 mm/seg.

Todas las pruebas densitométricas fueron realizadas por el mismo investigador. Se almacenaron las imágenes en el ordenador para su estudio ulterior. Se calculó la DMO (g/cm^2), el CMO (g) y el AREA (cm^2) de cada región (Fig. 16).

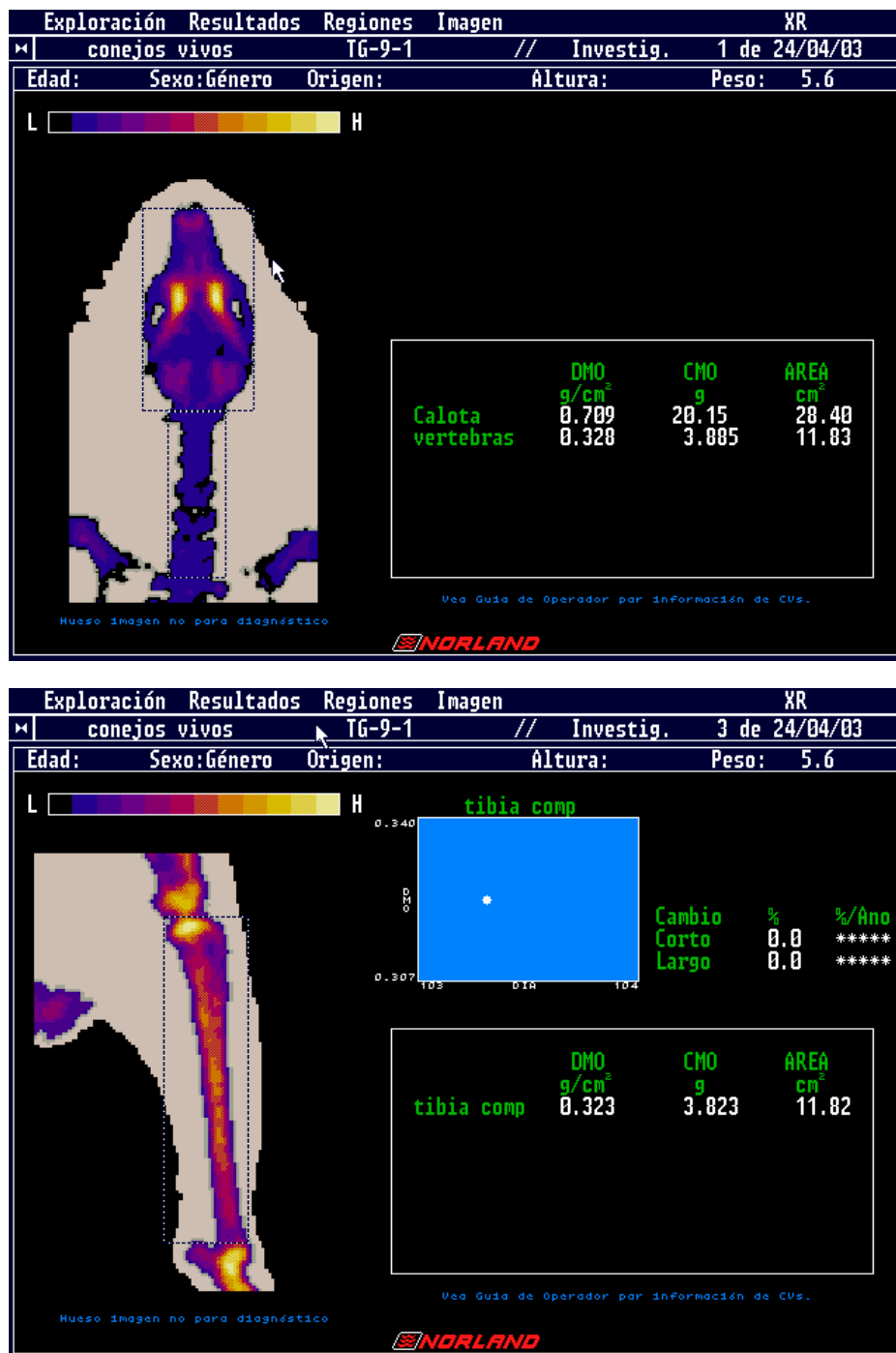


Fig 16. Imágenes del *software* que acompaña al densitómetro: (a) Densitometrías de calota y columna y (b) de tibia.

4.2.1.3. Fase de ovariectomía bilateral más dieta hipocálcica

A la semana, se sometió a los animales a una ovariectomía bilateral bajo anestesia general (inducida del modo ya descrito anteriormente). Antes de la cirugía, se rasuró la piel del abdomen y se limpió cuidadosamente con una solución yodada (Betadyne®) (Figs.17 y 18). Tras la cirugía, se prescribió antibioterapia oral (oxitetraciclina) y fueron alimentadas con la dieta estándar de laboratorio y agua *ad libitum* durante 1 semana. Tras este tiempo, se le suministró la dieta hipocálcica (tabla XII), durante 6 semanas.

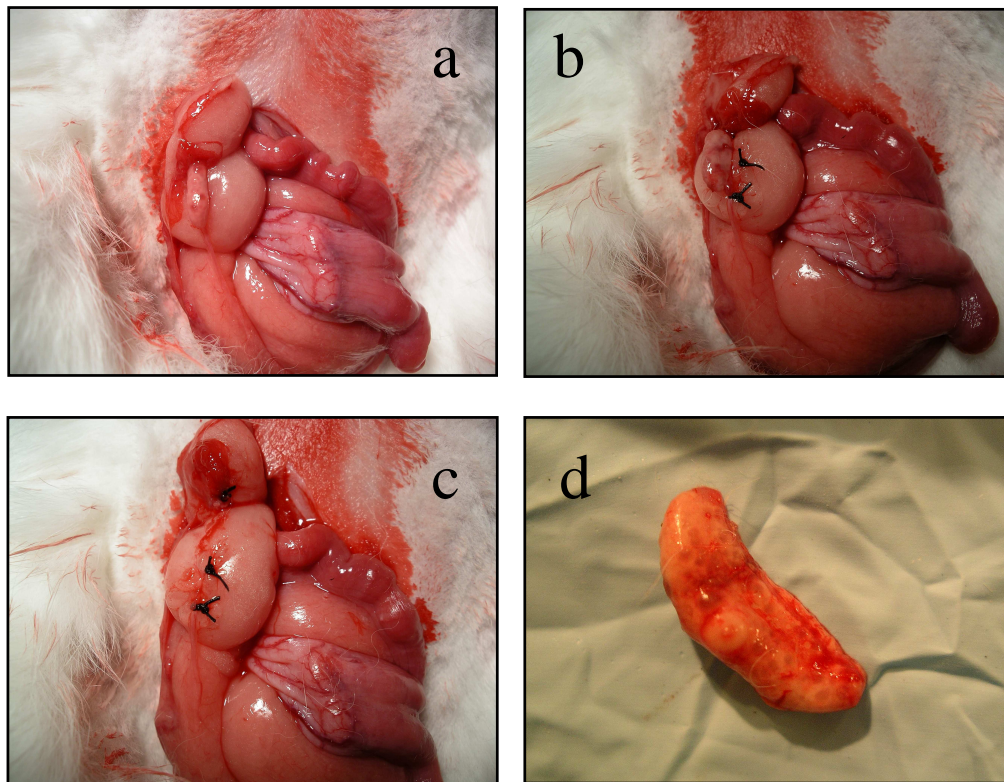


Figura 17. Secuencia de ovariectomía: (a) Localización del ovario, (b) puntos pasantes, (c) ovario extirpado, (d) detalle del ovario.

Tabla XII. Dieta pobre en calcio: 0,07 % Ca^2 vs. 0,45 % Ca^2 de la dieta estándar del conejo (Nutrient Requirements of Rabbits 1977)	
NUTRIENTES	PORCENTAJE
Cebada	74,2 %
Salvado de trigo	20 %
Soja	5%
Sal	0,3 %
Corrector	0,5 %

Durante este periodo de tiempo, nueve de los animales fallecieron por diversas causas.

A las siete semanas de la ovariectomía, se volvieron a repetir las mediciones densitométricas siguiendo el procedimiento ya descrito anteriormente (Fig. 18).

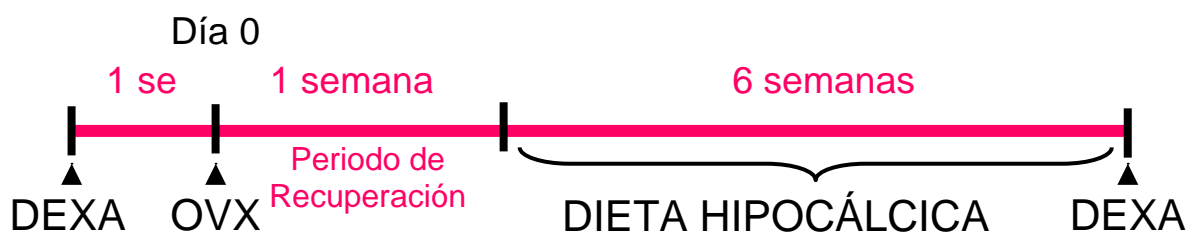


Fig. 18: Esquema de tiempos en la fase de osteoporosis experimental.

4.2.1.4. Tratamiento estadístico de los resultados

Para finalizar se procedió a la elaboración de los resultados y al análisis estadístico de los mismos, mediante la aplicación del test de MUESTRAS PAREADAS con el programa informático StatGraphics® 5.0. Los datos se expresaron en medias \pm desviación estándar y se consideró estadísticamente significativo una $P < 0.05$. Se compararon fundamentalmente las DMOs de las distintas regiones de estudio, antes y después de la ovariectomía más dieta hipocálcica. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (R) para establecer la correlación entre las diferencias de DMO antes y después de la OVX+DIETA entre los distintos grupos.

4.2.2. METODOLOGÍA DE LA FASE COLOCACIÓN DE IMPLANTES Y GH

4.2.2.1. Fase de osteoporosis experimental

Las 16 conejas se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos; a ocho de las conejas se les practicó la ovariectomía bilateral bajo anestesia general (grupo OVX) y se les suministró la dieta hipocálcica (tabla XII), mientras que las ocho restantes pasaron a formar el grupo de animales intactos (INTACTO) (Fig. 19). La anestesia general se indujo con una inyección de 0'75 mg/kg de ketamina intramuscular (Imalgene 1000®) más 0'25 mg/kg de xylazine (Rompún 2%®) (Weisbroth and Fudens, 1972; Green y *et al*, 1981).

4.2.2.2. Cirugía de colocación de los implantes

Seis semanas después, los animales fueron anestesiados, como ya se ha descrito anteriormente y se colocaron 32 implantes roscados de titanio en la cara medial de las tibias de las conejas por ser una zona libre de inserciones musculares (un implante por tibia, colocados aproximadamente un centímetro por debajo de la tuberosidad tibial anterior y monocorticales) (Fig. 20), todo ello en condiciones de asepsia. Para labrar los

lechos implantarios, se utilizaron fresas a baja velocidad (< 800 r.p.m.) y profusa irrigación con suero salino estéril. Posteriormente, los grupos OVX e INTACTO fueron subdivididos en 2 grupos, en función de la administración o no de la GH local.

En los grupos OVX-GH e INTACTO/GH, de 5 conejas cada uno, se administraron 2 U.I. de GH recombinante humana (rhGH) (Saizen ®, Laboratorios Serono, Madrid) en el interior del lecho óseo, justamente antes de la colocación del implante.

En los grupos OVX/CONTROL e INTACTO/CONTROL (de 3 conejas cada uno) no se colocó ninguna sustancia en la herida quirúrgica.

A las dos semanas de la cirugía de colocación de implantes, se sacrificó a los animales con una inyección de pentobarbital sódico IV a dosis letal.

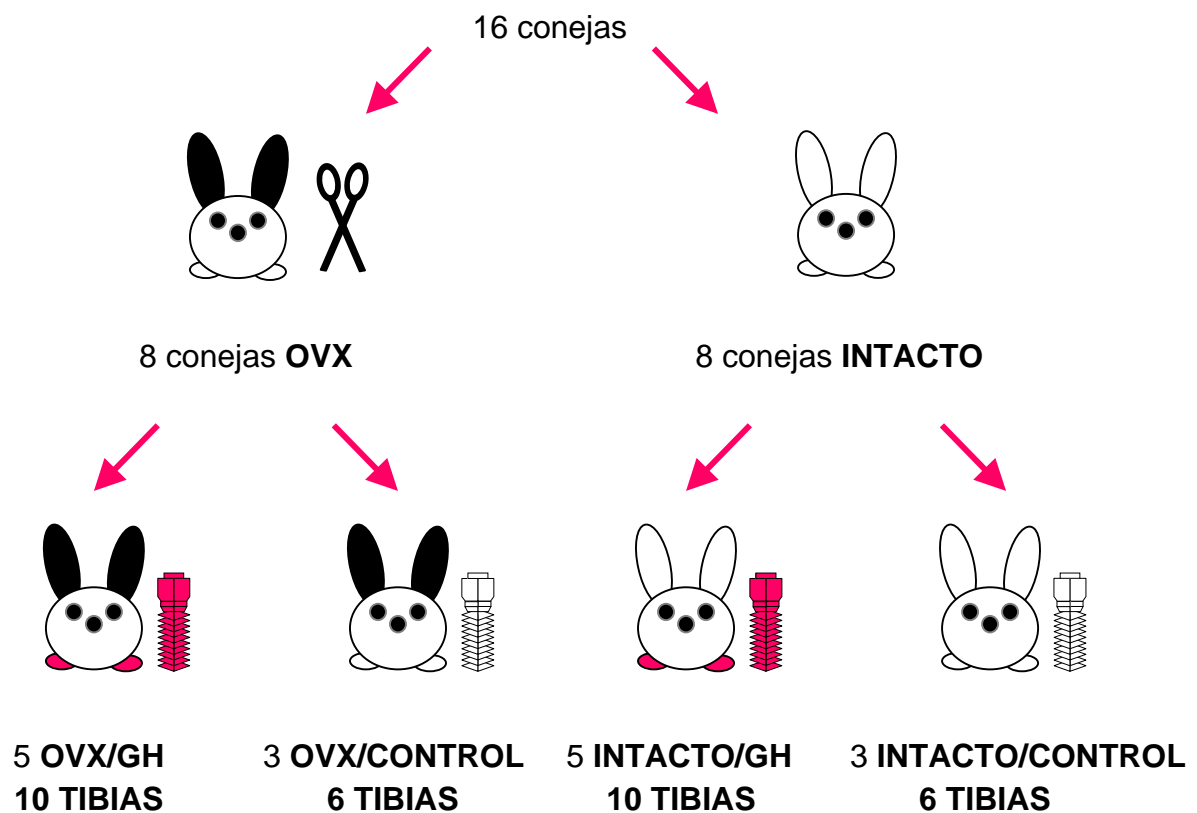


Fig. 19. Grupos experimentales.

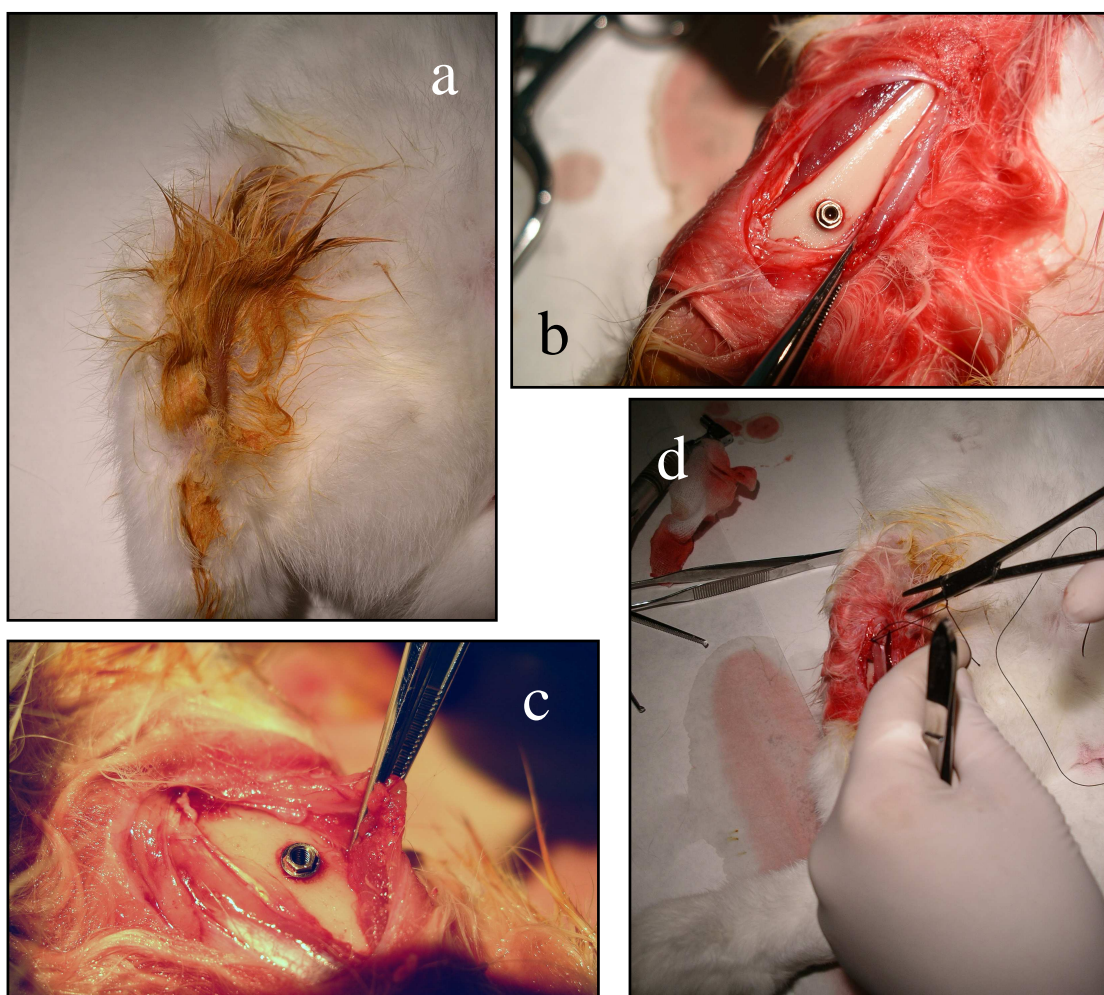


Figura 20. Secuencia cirugía de colocación de los implantes: (a) Aplicación de solución yodada, (b) y (c) Implante colocado en cara ántero-medial de la tibia, (d) Sutura por planos.

4.2.2.3. Medición de la Densidad Mineral Ósea mediante el análisis con absorciometría dual fotónica de rayos x (DEXA).

Se diseccionaron las tibias y se sumergieron en una solución de formaldehído al 10% tamponada a pH 7, para evitar la desnaturalización de las proteínas, almacenándolas en frigorífico hasta realizar el análisis densitométrico (DEXA).

La DMO se cuantificó en g/cm^2 . El análisis DEXA se llevó a cabo en un densitómetro NORLAND XR-26 ® (versión 2.3) en el modo investigación; previamente se calibró el aparato. Todas las tibias se colocaron sobre la superficie de la camilla con su borde anterior hacia craneal, e intentando que el implante se situase lo más perpendicular posible al rayo incidente, para facilitarle al programa el análisis de las áreas (Fig. 22). Se procedió al estudio de cada tibia completa a una velocidad de 40 mm/s (con una resolución espacial de $1.0 \times 1.0 - 0.5 \times 0.5$) y se almacenaron las imágenes en el ordenador para su procesamiento ulterior. Este estudio llevó aproximadamente 15 minutos por tibia. Se seleccionaron siete regiones de interés de cada imagen almacenada, a saber: "TOTAL", "1/3", "1/9", "LATERAL", "IMPLANTE", "SUMA", y "ALREDEDOR" (Fig. 21) y el programa proporcionó los valores de DMO, CMO y ÁREA de cada una de ellas. Este estudio se realizó en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid).

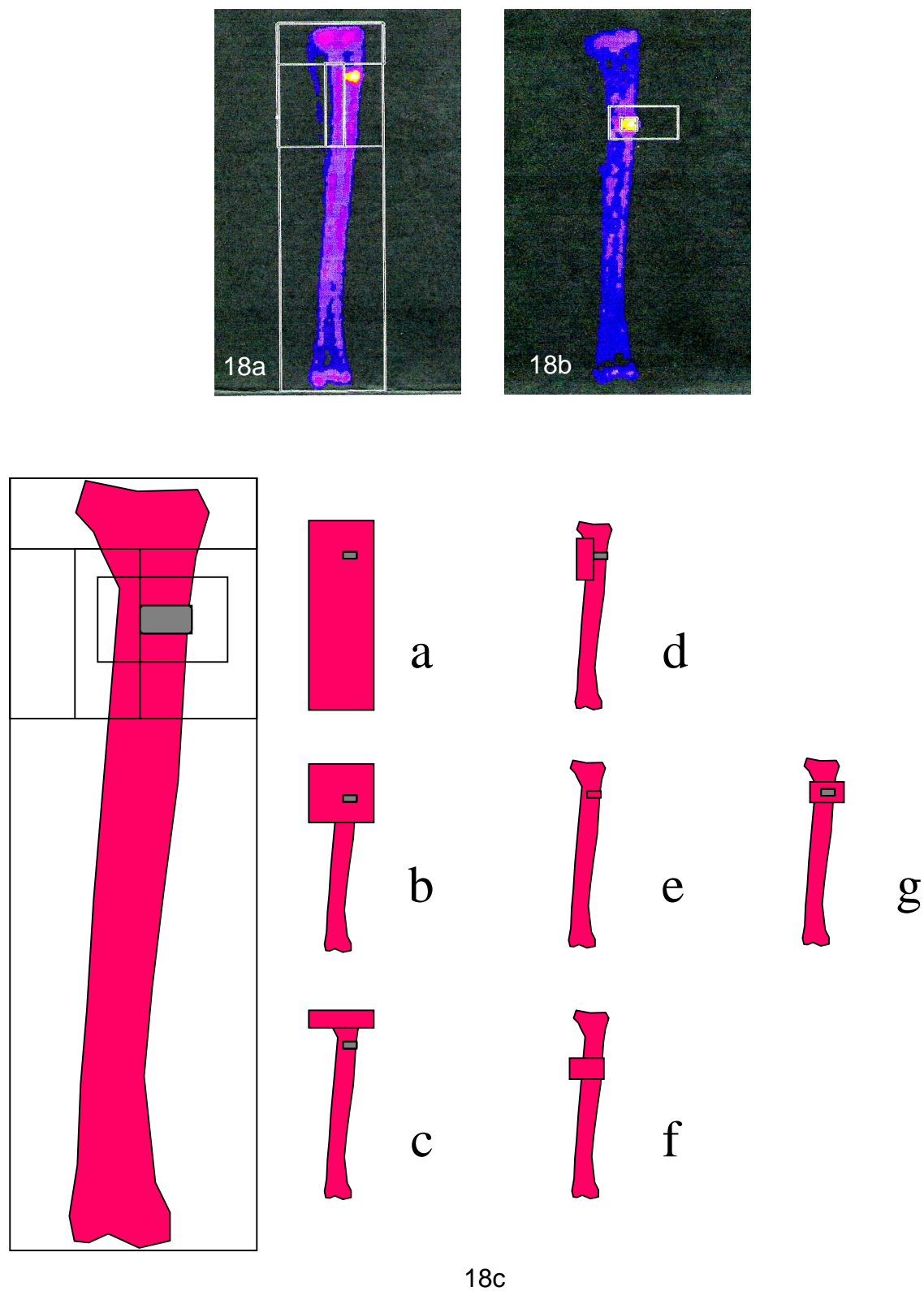


Figura 21. (18a) y (18b): Imágenes del *software* del densitómetro Norland donde se observan las regiones definidas sobre la tibia. (18c): Esquema de las regiones definidas para el análisis mediante DEXA: a) TOTAL, b) 1/3, c) 1/9, d) LATERAL, e) IMPLANTE, f) SUMA, g) ALREDEDOR

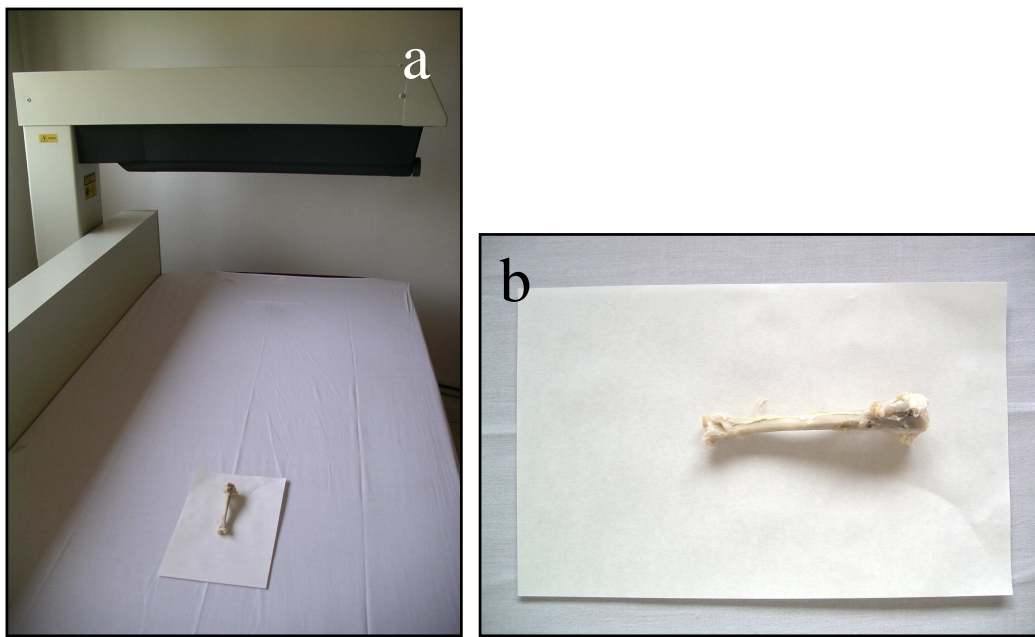


Figura 22: (a) Densitómetro Norland®, (b) detalle de la tibia colocada en la camilla con su borde anterior hacia arriba

4.2.2.4. Preparación de las muestras

Tras realizar el análisis DEXA, se eligió la parte proximal de las tibias, donde estaba situado el implante, para incluir estas muestras en 2-hidroxietilmetacrilato y en Tecnovit 7200®, en concentraciones crecientes y durante 2 meses, con el fin de que toda la muestra se incluyera correctamente (basado en el método de Donath y Breuner, 1982). Posteriormente se polimerizaron durante 8 horas (dos horas con luz blanca y seis con luz azul) utilizando una lámpara de luz ultravioleta (Exakt®) hasta conseguir un bloque homogéneo (Fig. 23).

Cada bloque de metacrilato de 2 cm de grosor fue montado y cortado sucesivamente con el microtomo Exakt® y pulido con la pulidora Exakt® hasta conseguir cinco o seis preparaciones de cada espécimen de aproximadamente 70 μ , susceptibles de ser teñidas, para su posterior estudio con microscopio óptico (Fig. 23).

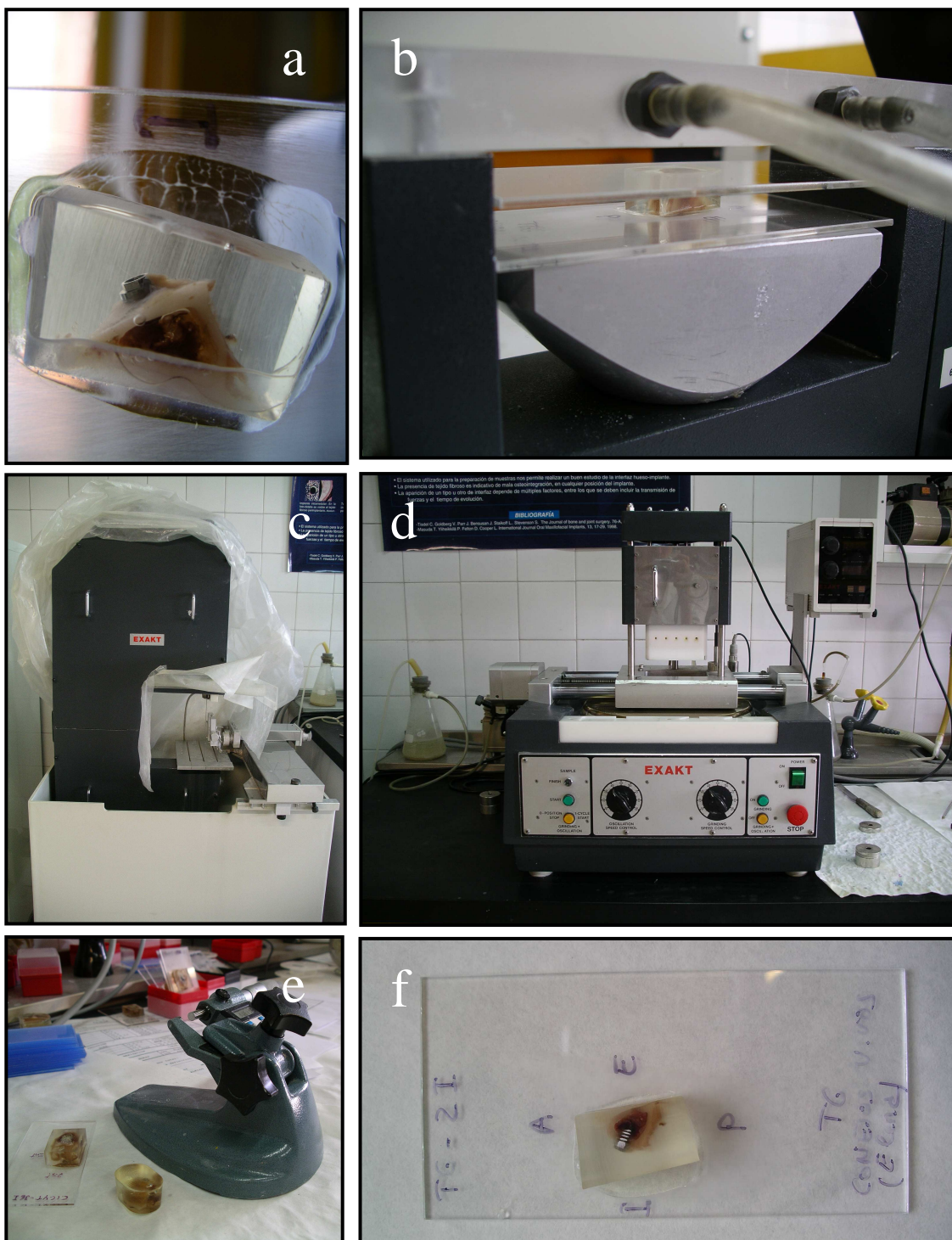


Figura 23. (a) Bloque de metacrilato ya cortado y montado en el portaobjetos, (b) Máquina de paralelizado de portaobjetos, (c) Recortadora Exakt®, (d) Pulidora Exakt®, (e) Calibradora, (f) Portaobjetos con muestra preparada para cortar.

4.2.2.5. *Análisis histomorfométrico*

A.1. Microscopía óptica

Se realizaron tinciones histológicas de Tricrómico de Masson, Azul de Toluidina, Azul Alcían, Hematoxilina-Eosina y Sirius, siguiendo el protocolo del Laboratorio de Anatomía Microscópica del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UAH (Madrid).

Para el estudio de los proteoglicanos y las glicoproteínas presentes en el hueso se aplicaron las tinciones de Azul Alcían y Azul de Toluidina:

* *Azul Alcían*: sirve para determinar los mucopolisacáridos ácidos y pone de manifiesto la presencia de proteoglicanos ácidos sulfatados (se tiñen de azul y forman estrías) (Fig. 24).

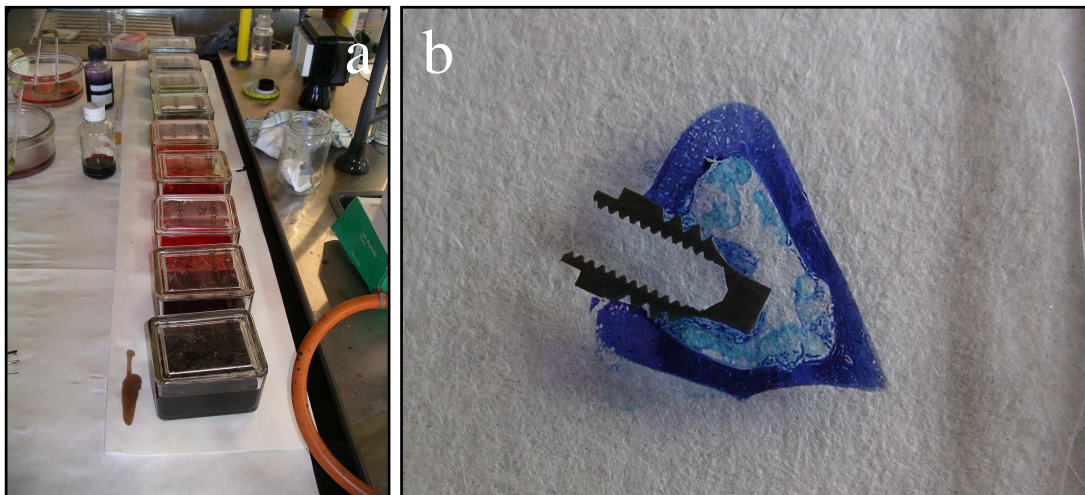


Figura 24. (a) Tintes utilizados en las preparaciones histológicas de Tricrómico de Masson, (b) Preparación histológica con tinción de Azul Alcían.

* *Reacción metacromática de azul de toluidina:* también se utiliza para demostrar la existencia de mucopolisacáridos ácidos, que se tiñen en rojo o púrpura, en contraste con el azul del resto, y sobre todo para observar las células óseas que se tiñen ortocromáticamente con una calidad superior a la obtenida con la técnica de hematoxilina-eosina (Fig. 25).

En otros métodos utilizados para estudiar diversos componentes del hueso no tiene lugar una reacción química, sino que la coloración se obtiene por mecanismos físicos o fisicoquímicos en los que intervienen factores tan diferentes como la densidad y/o la textura de las estructuras. Se utilizaron los siguientes:

* *Tinción de tricrómico de Masson:* sirve para la demostración de las fibras colágenas; permite diferenciar en verde el tejido óseo calcificado y en naranja-rojo el osteoide no calcificado. El conjuntivo se tiñe en rojo y los núcleos en azul negruzco (Figs. 24 y 25).

* *Tinción de Sirius (rojo sirio)* que, al polarizarse, permite ver la birrefringencia de las fibras de colágeno (Fig. 25).

* *Hematoxilina Weigertt - eosina,* proporciona una coloración de conjunto y permite diferenciar células, ya que la hematoxilina tiñe el núcleo y la eosina el citoplasma celular (Fig. 25).

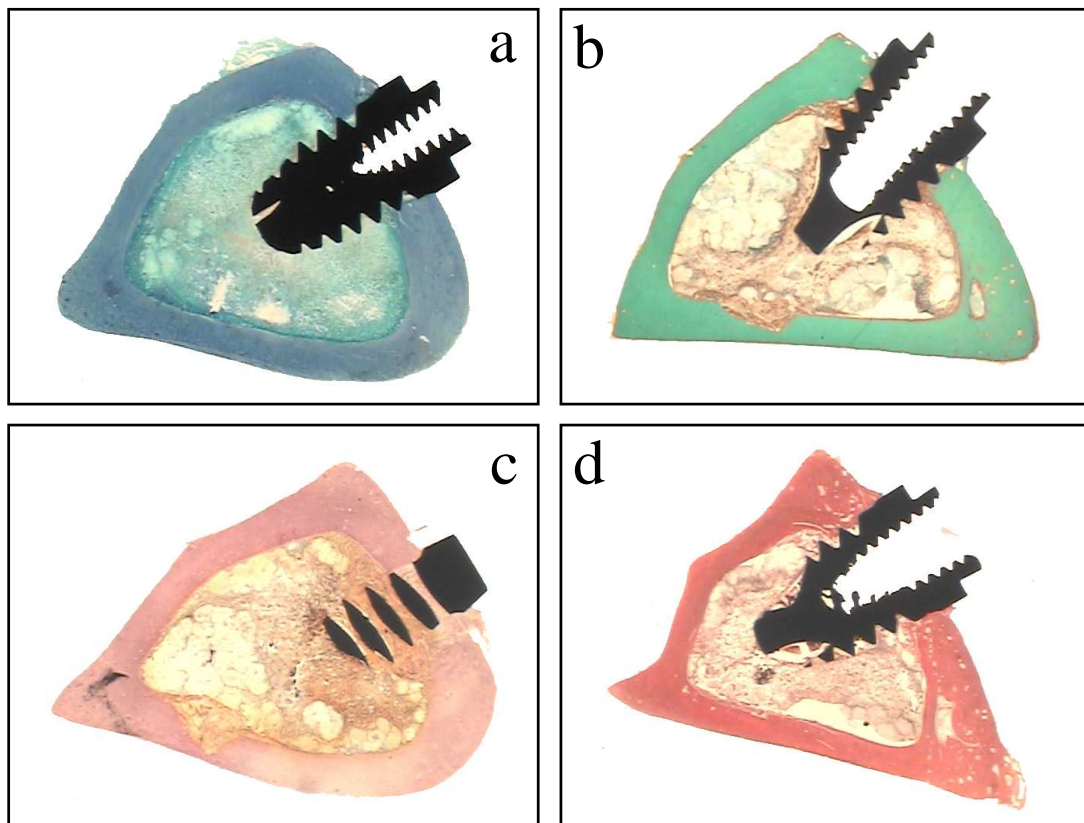


Figura 25. Tinciones: (a) Azul de Toluidina, (b) Tricrómico de Masson, (c) Rojo Sirius, (d) Hematoxilina Weigert-eosina

En el estudio histológico se han analizado los posibles cambios o modificaciones en toda la cortical del hueso, incluyendo endostio y periostio, la cortical que está siendo atravesada por el implante y la respuesta tisular alrededor del implante dentro de la cavidad medular.

A.2. Morfometría

Con el fin de cuantificar la reacción ósea periimplantaria, se llevó a cabo el estudio morfométrico, mediante el analizador de imágenes MIP-4, que es un sistema informático de análisis de imagen con cámara fotográfica acoplada al microscopio óptico y lupa óptica. (Fig. 26).

El método de captura de imágenes permite relacionar la parte de implante en contacto con hueso, eliminando aquellas zonas que no interesan para la investigación (Fig. 26).

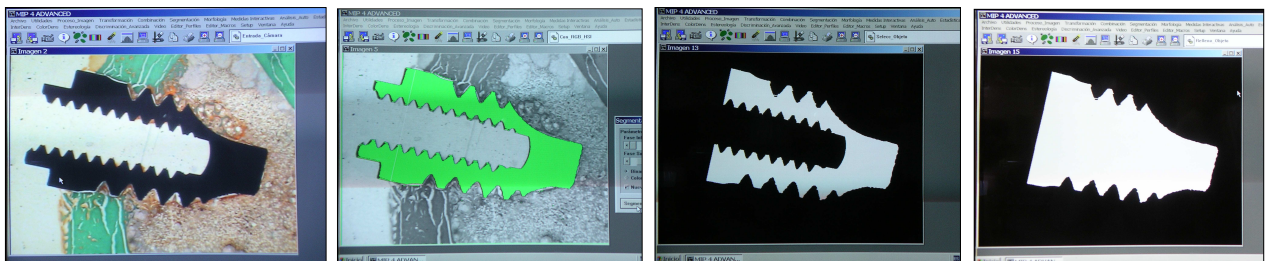
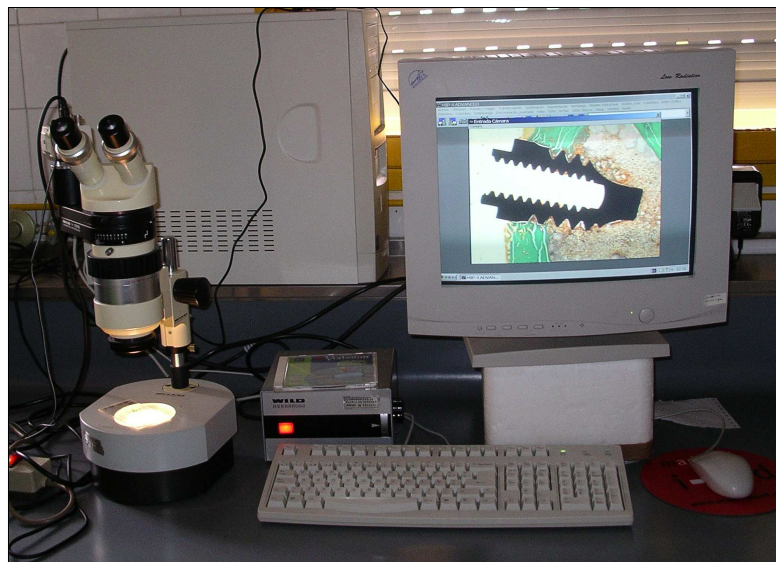


Fig 26. Lupa óptica acoplada al ordenador. El analizador de imágenes MIP-4 permite capturar y modificar las imágenes de las tinciones.

Las variables a estudiar son:

1. Cálculo del área de implante incluida dentro del hueso (despreciando la parte que queda fuera de la cortical) de cada preparación (**área imp**), que incluye tanto el tejido óseo como la cavidad medular y el tejido en neoformación.
2. Cálculo del perímetro implantario de cada preparación (despreciando la parte que queda fuera de la cortical) (**peri imp**).
3. Determinación de la línea tangente al hueso cortical que corta el implante separando la parte incluida dentro del hueso, de la que queda fuera, llamada **línea de cierre** (Fig. 27).
4. Cálculo del perímetro de estudio, entendiendo por tal el perímetro implantario menos la línea de cierre (**per estudio**).
5. Análisis de la superficie total de implante en contacto directo con hueso, esto es, el perímetro de hueso (**per hueso**).
6. Estimación del porcentaje de osteointegración o índice de afinidad (**% osteo**), también conocido como *bone-to implant-contact (BIC)* de cada preparación, que se halla dividiendo el perímetro de hueso entre el perímetro de estudio y multiplicando por cien (Tresguerres 2003):

$$\% \text{ osteointegración} = BIC = \frac{\text{Per hueso}}{\text{Per estudio}} \times 100$$

Puesto que hay varias preparaciones por tibia, posteriormente se calcula la media aritmética de los porcentajes de osteointegración correspondientes a cada una, obteniendo una media del *BIC* de cada tibia.

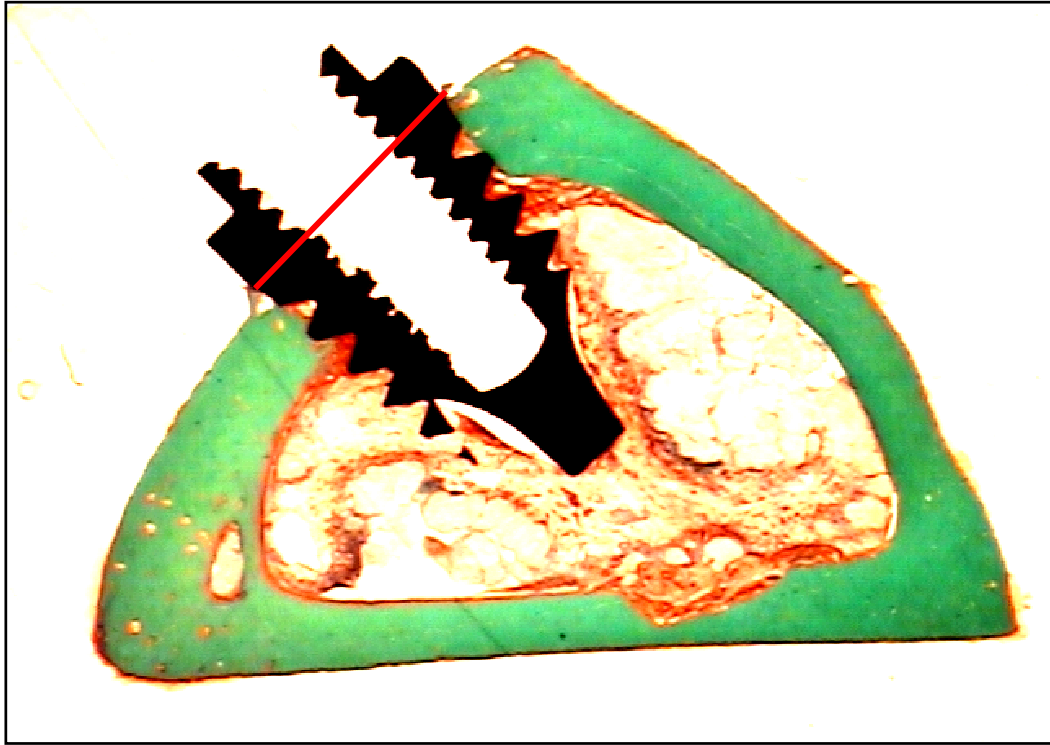


Figura 27. Línea de cierre en rojo

4.2.2.6. Tratamiento estadístico de los resultados

Se procedió al procesamiento de los resultados y al análisis estadístico de los mismos, mediante la aplicación del test de muestras pareadas, del test de ANOVA multifactorial a una vía y del test de Regresión Lineal con el programa informático StatGraphics® 5.0. Se compara fundamentalmente la influencia de los factores ovariectomía y GH en los *BIC* de los distintos grupos y su correlación con los resultados densitométricos.

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DE LA FASE DE OSTEOPOROSIS EXPERIMENTAL

Tras realizar las densitometrías con anestesia general, 9 de las 25 conejas murieron por distintos motivos.

En la primera parte de este trabajo, se pretendía comprobar *in vivo* el efecto de la ovariectomía bilateral más dieta hipocálcica sobre la densidad mineral ósea en tres puntos de la anatomía de los animales de experimentación (CALOTA, COLUMNA y TIBIA).

La tabla XIII muestra las variaciones del valor de *t* en los animales antes y después de la ovariectomía más dieta hipocálcica (Tabla XIII).

Tabla XIII. Variaciones de DMO antes y después de la ovariectomía más dieta hipocálcica			
RESULTADOS	Valores base DMO (mg/cm ²)	Post-ovariectomía DMO (mg/cm ²)	Test <i>t</i>
Columna cervical	0.326 ± 0.023	0.300 ± 0.023	*0.0013
Calota	0.708 ± 0.039	0.672 ± 0.047	*0.0005
Tibia	0.335 ± 0.019	0.322 ± 0.031	0.1020
Los datos se muestran como media ± D.S.			
DMO se expresa en miligramos por centímetro cuadrado			
* representa valores significativos de la variación de la DMO según el test- <i>t</i> de la hipótesis nula (p<0.05)			

Siete semanas tras la ovariectomía, se aprecia una disminución en la DMO en las tres regiones estudiadas, siendo muy significativa en la calota y la columna cervical.

En la figura 28 se observan gráficamente las variaciones de la DMO en las tres localizaciones anatómicas (Fig. 28).

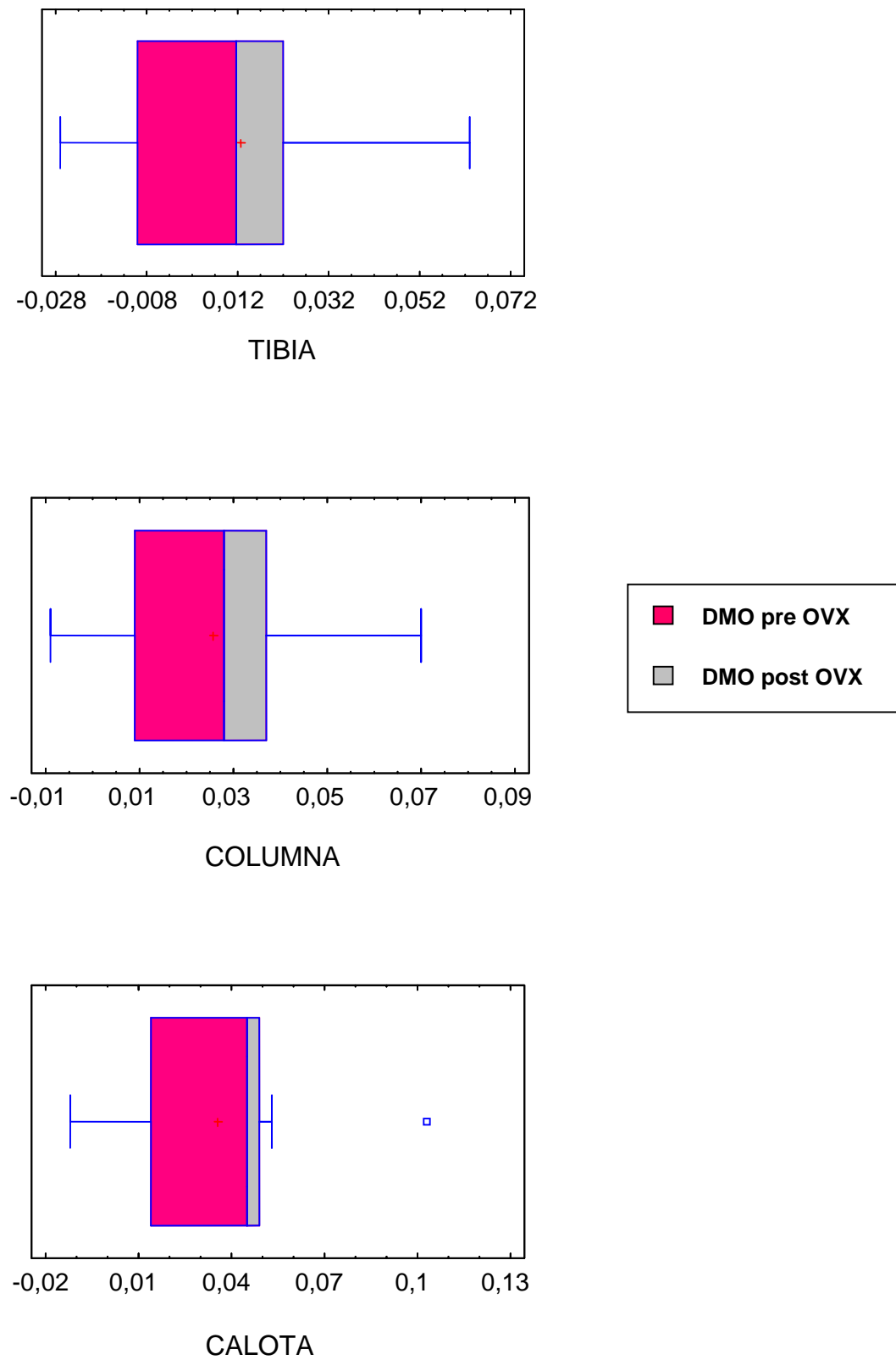


Fig. 28. Gráficos de cajas y dispersión de la densidad previa y posterior a la ovariectomía más dieta hipocálcica.

La correlación múltiple de las diferencias de DMO antes y después del procedimiento de ovariectomía más dieta hipocálcica en las distintas regiones estudiadas se muestra en la figura 29 y tabla XIV, (Fig. 29, Tabla XIV).

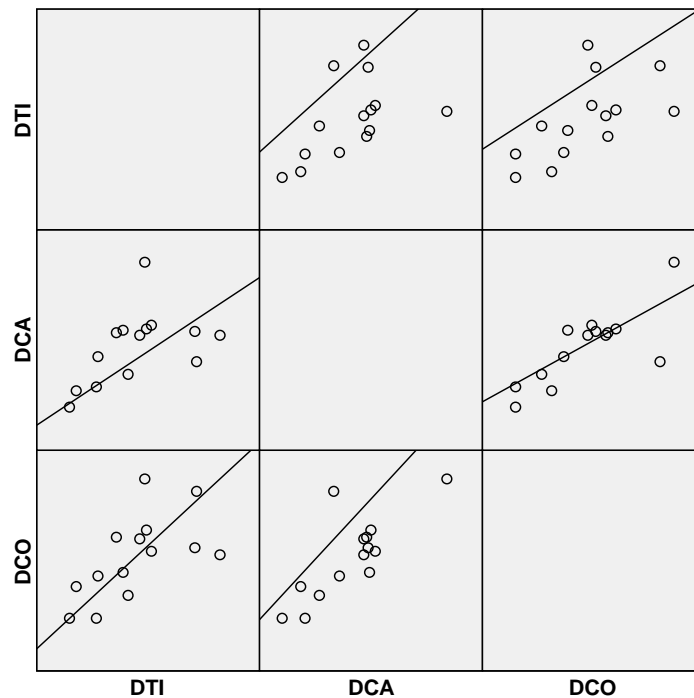


Fig 29. Gráfico de correlación múltiple entre las tres diferencias de DMO:
DTI = DMO de la TIBIA pre OVX menos DMO de la TIBIA post OVX,
DCA = DMO de la CALOTA pre OVX menos DMO de la CALOTA post OVX,
DCO = DMO de la COLUMNA pre OVX menos DMO de la COLUMNA post OVX

Tabla XIV. Correlaciones

		DTI	DCA	DCO
DTI	Correlación de Pearson	1	,499	,616(*)
	Sig. (bilateral)		,069	,019
	N	14	14	14
DCA	Correlación de Pearson	,499	1	,781(**)
	Sig. (bilateral)	,069		,001
	N	14	14	14
DCO	Correlación de Pearson	,616(*)	,781(**)	1
	Sig. (bilateral)	,019	,001	
	N	14	14	14

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Existe una correlación estadísticamente significativa ($p = 0,01$) entre la diferencia de DMO en CALOTA y COLUMNA, así como entre la de TIBIA y COLUMNA ($p = 0,19$). En el gráfico de la figura 30 se observa como la DTI está más cerca de la DCO que de la DCA, y como DCO y DCA están más próximas entre sí, formándose un ángulo entre ellas muy agudo, lo que significa que están bastante correlacionadas (Fig. 30).

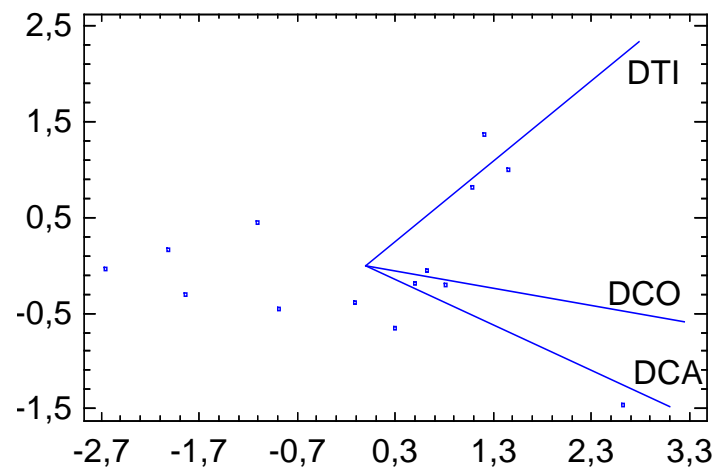


Fig. 30. Gráfico de componentes. El coseno del ángulo formado entre dos diferencias de DMO tiende más a 1 (correlación 100%) cuanto más agudo es el ángulo.

5.2. RESULTADOS DE LA FASE DE COLOCACIÓN DE IMPLANTES-GH

En el presente estudio, se distinguieron cuatro grupos bien diferenciados: por un lado las conejas ovariectomizadas que ingirieron la dieta hipocálcica (en adelante “ovariectomizadas” (OVX), que fue dividido en dos subgrupos, las que recibieron en el lecho del implante hormona del crecimiento en el momento de la colocación de la fijación (OVX-GH), y a las que no se les suministró el tratamiento (OVX-CONTROL); y un segundo grupo de conejas no ovariectomizadas (INTACTO), a las que se les aplicó el mismo procedimiento que en el grupo anterior, con hormona del crecimiento (INTACTO - GH) y sin hormona (INTACTO - CONTROL).

En el **análisis histológico** se describen la respuesta cortical, transcortical y medular de los cuatro grupos de estudio. La variable a estudiar en el **análisis morfométrico** es el porcentaje de osteointegración o *BIC* y los posibles factores que influyen son tres: la ovariectomía, la aplicación de hormona del crecimiento y la tibia donde se situó el implante (derecha o izquierda). En los datos del **análisis DEXA**, las variables a estudiar son la DMO, el CMO y el ÁREA de las distintas regiones definidas. Con el fin de valorar la precisión del aparato, se procedió a colocar una tibia en la camilla y efectuar 5 veces la densitometría sin volver a tocarla para nada. Posteriormente obtuvimos los valores de DMO, CMO y AREA de la tibia completa en cada una de las 5 mediciones. Los resultados se muestran en la tabla XV (Tabla XV).

Tabla XV. Medidas para comprobar el error del densitómetro.			
	DMO	CMO	AREA
1ª densitometría	0.303	4.243	14.00
2ª densitometría	0.302	4.205	13.93
3ª densitometría	0.298	4.221	14.16
4ª densitometría	0.298	4.180	14.00
5ª densitometría	0.299	4.133	13.81
Media	0.300	4.196	13.98
Varianza	0.0000055	0.0017848	0.01615
Desviación estandar	0.00234521	0.0422469	0.127083

Los resultados histológicos, morfométricos y densitométricos obtenidos de la comparación de los distintos grupos son los se presentan a continuación.

5.2.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

La observación de las muestras al microscópio óptico, proporciona los siguientes datos:

5.2.1.1. Grupo *INTACTO- CONTROL*

La cortical aparece compacta. Se aprecian algunas líneas de osteoblastos en el hueso periimplantario.

El endostio cercano al implante emite trabéculas hacia el mismo, y las características de estas trabéculas se corresponden con las de hueso joven (lagunas de osteocitos grandes, abundantes, desorganizadas y fibras de colágeno cortas y parcialmente desorganizadas).

La imagen de conjunto muestra, en general, signos escasos de neoformación, que predominan a nivel de las trabéculas periimplantarias. El crecimiento a expensas del periostio es escaso y sólo aparece alrededor del implante (Figs. 31-36)

5.2.1.2. Grupo *INTACTO-GH*

No se aprecian diferencias histológicas importantes frente al grupo sin GH, aunque sí existe mayor estímulo óseo que en el grupo anterior. (Figs. 31-36).

5.2.1.3. Grupo *OVX-CONTROL*

Aunque la cortical muestra un aspecto compacto, sí hay diferencias en el tejido en neoformación cuando se compara con el grupo INTACTO-CONTROL. La zona periimplantaria presenta menos crecimiento óseo y, cuando lo hay, se caracteriza por

aparecer en forma de tejido osteoide (hueso neoformado no calcificado) (Figs. 33, 34, 36 y 37).

5.2.1.4. Grupo OVX-GH

Se aprecia mayor actividad de neoformación ósea alrededor del implante, cuando se compara con el grupo anterior, además el tejido neoformado es de tipo osteoide, pero también aparece hueso joven ya osificado. Se observan algunos signos de porosidad de la cortical, aunque escasos y restringidos a zonas cercanas al implante, apreciándose alguna imagen de osteoclastos a este nivel (Figs. 35, 36 y 38).

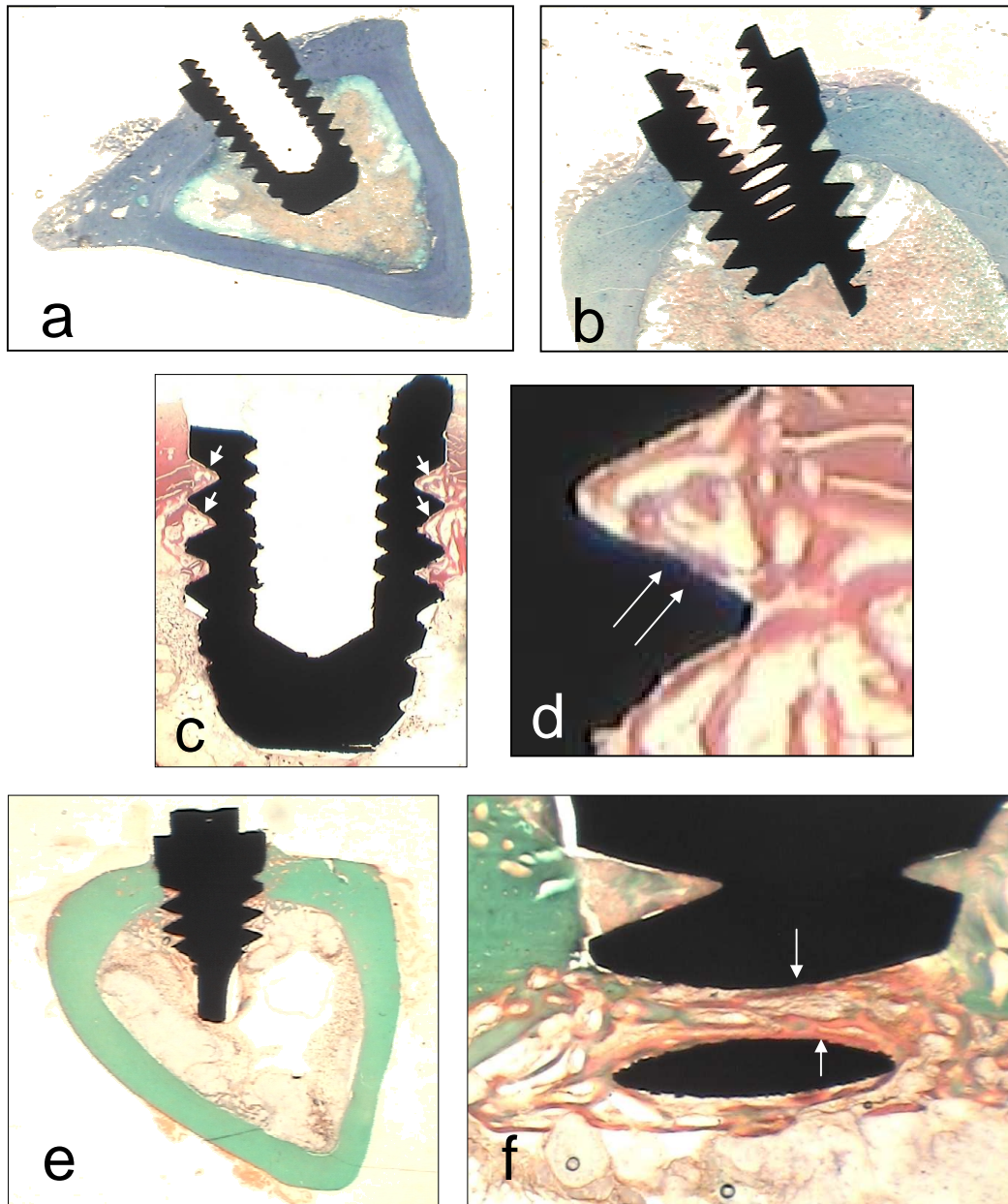


Fig 31. INTACTO/CONTROL. Imágenes de lupa; a) Tinción de azul de toluidina a 6 aumentos, visión general; b) tinción de azul de toluidina a 10 aumentos, se observa la reacción del endostio cercano al implante, emitiendo trabéculas óseas; c) tinción con hematoxilina-eosina a 17 aumentos, las flechas marcan las zonas de tejido neoformado en contacto íntimo con la superficie del implante, d) detalle de la anterior, las flechas marcan una zona de osteointegración; e) tinción de Masson a 6 aumentos, se observa crecimiento óseo en la cortical opuesta; f) tinción de Masson a 30 aumentos, se observa en color naranja el tejido osteoide, las flechas indican una zona de contacto con el implante.

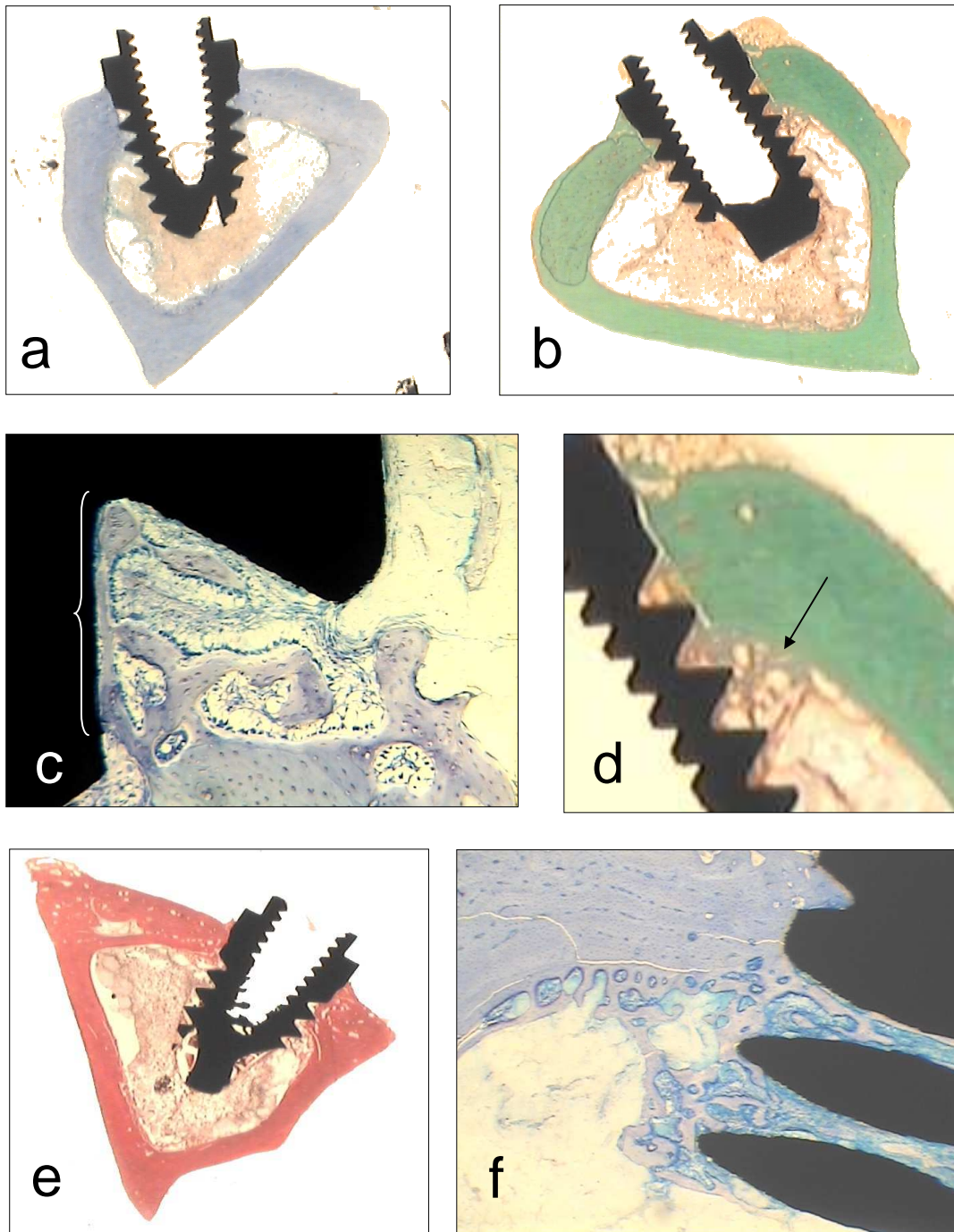


Fig 32. INTACTO/GH: a) tinción de azul de toluidina a 6 aumentos, visión general; b) tinción de Masson a 6 aumentos, se observa la cortical compacta; c) tinción de azul de toluidina a 60 aumentos, se observa una línea de osteoblastos en la zona de osteointegración, la llave indica la zona de contacto del hueso con el implante; d) detalle de b), el endostio emite trabéculas hacia el implante; e) tinción de hematoxilina-eosina a 6 aumentos, visión general; f) tinción de azul de toluidina a 30 aumentos, en azul claro, trabéculas óseas neoformadas en contacto con el implante.

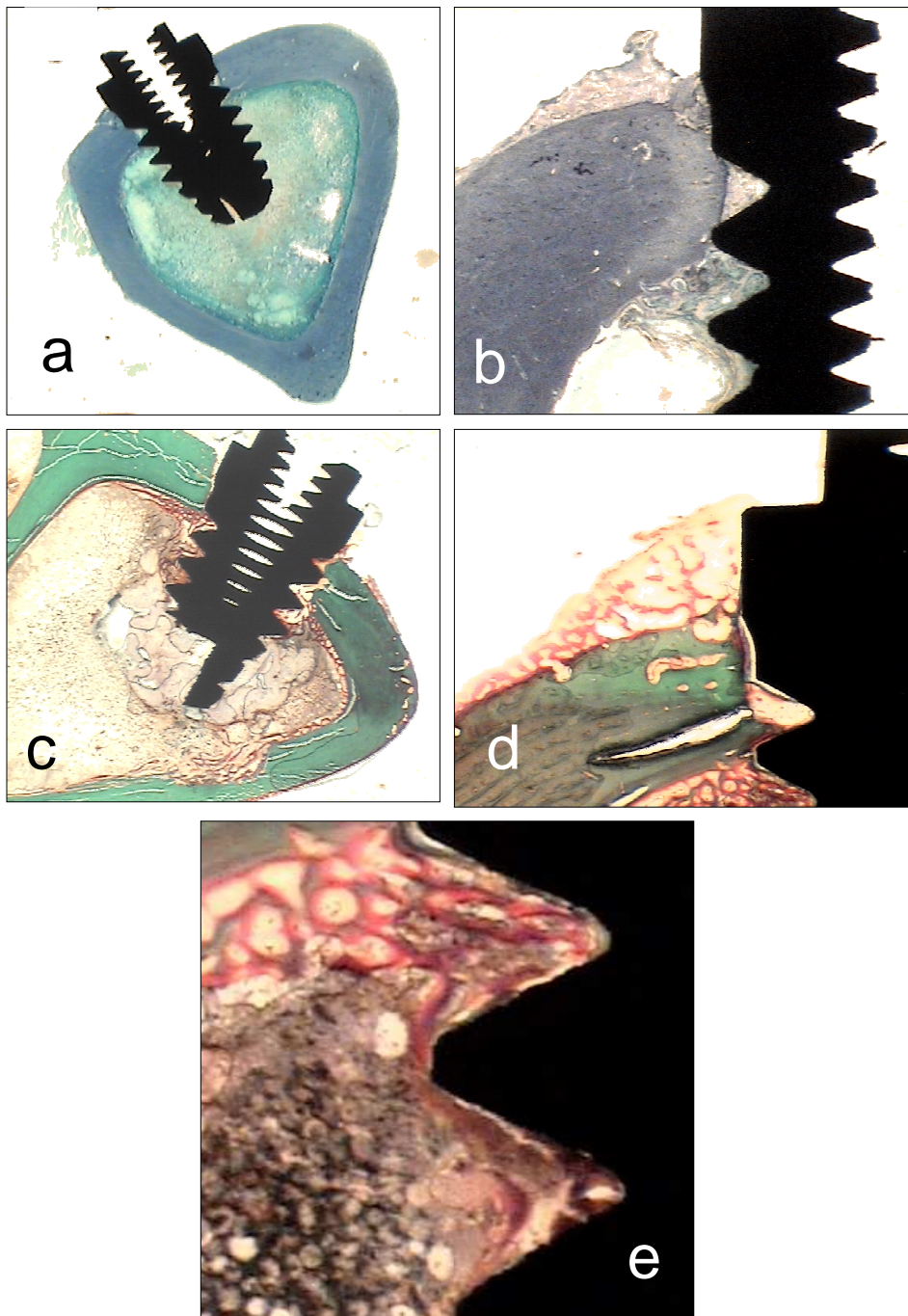


Fig 33. OVX/CONTROL: a) tinción de azul de toluidina a 6 aumentos, visión general; b) tinción de azul de toluidina a 25 aumentos, se observa buena calidad del hueso cortical y la escasa osteointegración; c) tinción de Masson a 9 aumentos, se aprecia el crecimiento del endostio, tanto en la zona coronal, como en la apical al implante; d) tinción de Masson a 22 aumentos, detalle del crecimiento perióstico; e) tinción de Masson a 30 aumentos, se evidencia la presencia de tejido osteoide neoformado (naranja) en el interior de las espiras del implante y entrando en contacto con el mismo.

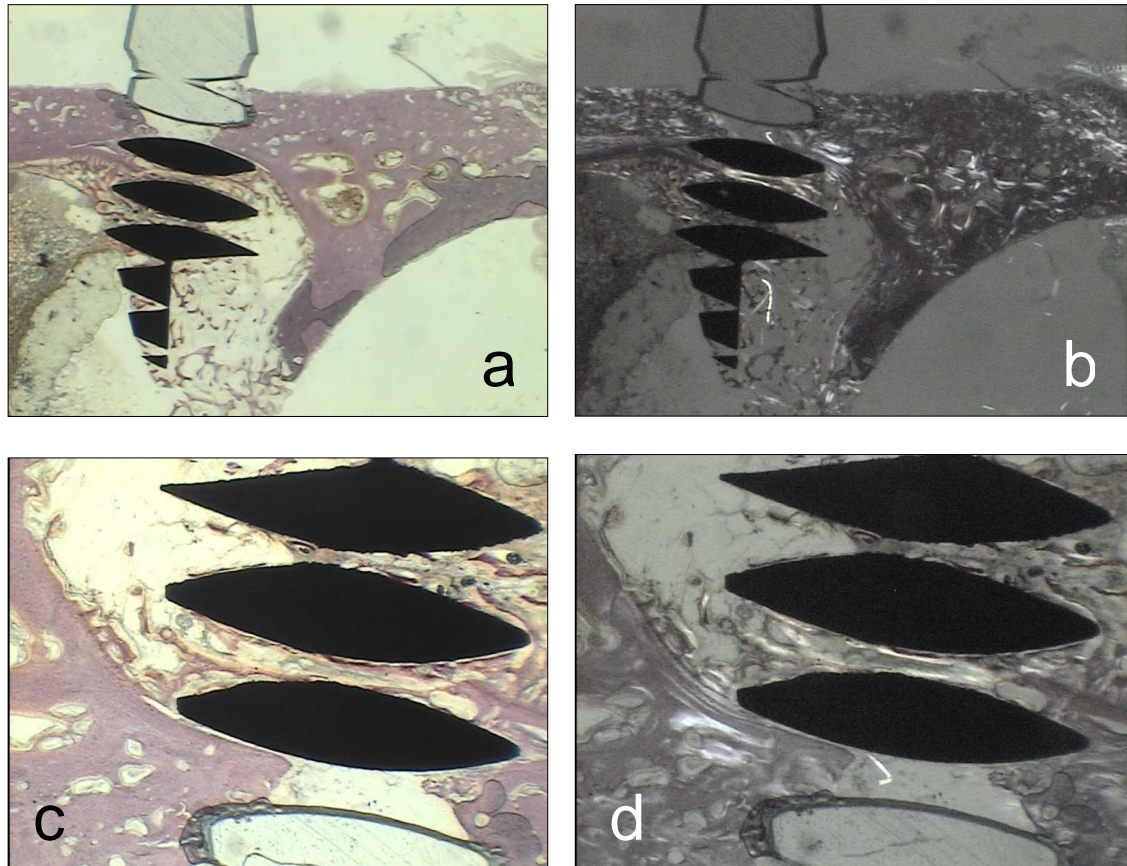


Fig 34. OVX/CONTROL: a) tinción de Sirius a 10 aumentos; b) tinción anterior vista con luz polarizada haciéndose evidentes las fibras de colágeno que se disponen paralelas a la superficie del implante; c) tinción de Sirius a 30 aumentos; d) tinción anterior vista con luz polarizada, en blanco brillante, las fibras de colágeno se disponen paralelas al implante.

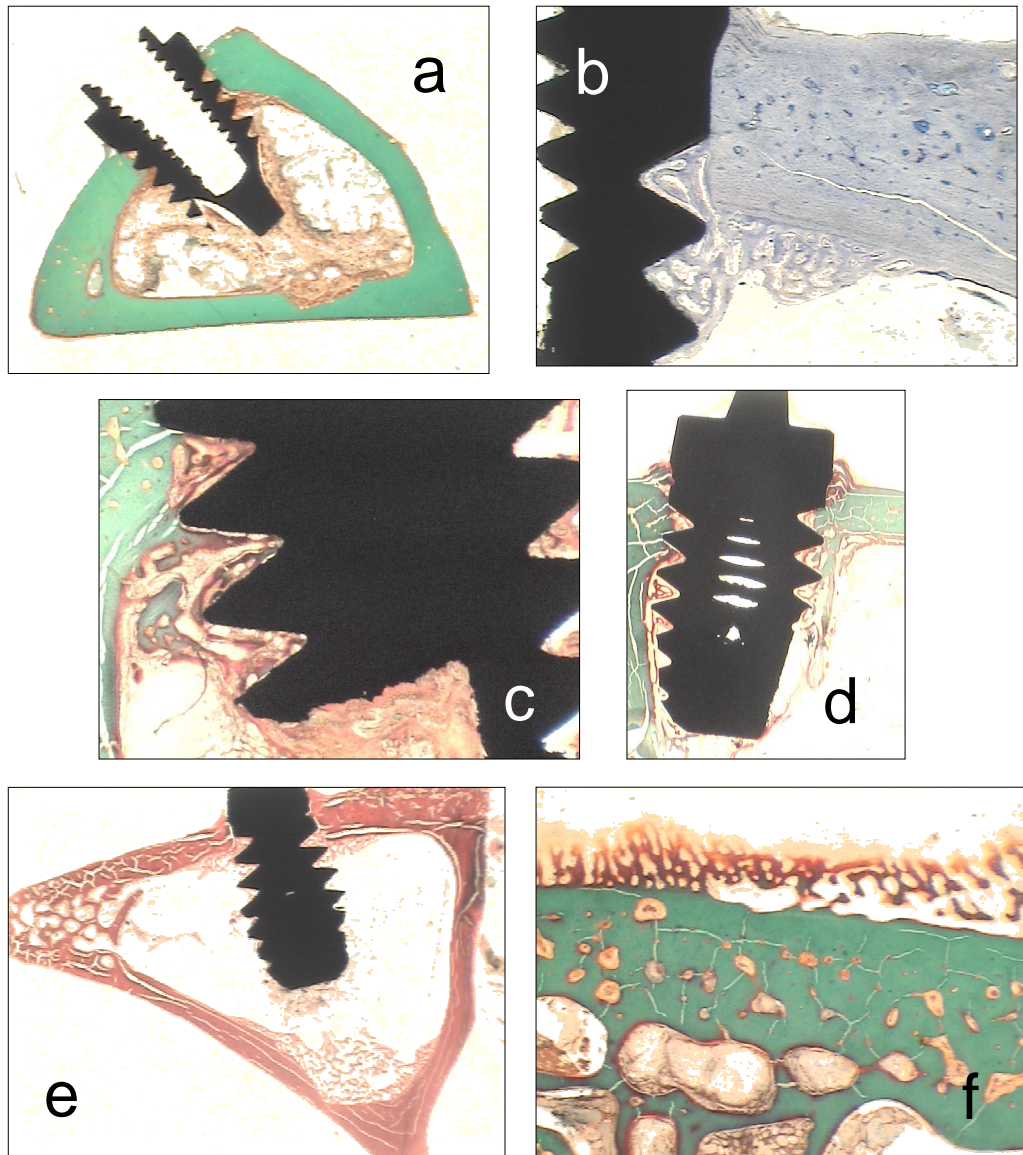


Fig 35. OVX/GH: a) tinción de Masson a 6 aumentos, visión general; b) tinción de azul de toluidina a 30 aumentos, se observa el remodelado del hueso cortical y el crecimiento desde el endostio; c) tinción de Masson a 30 aumentos, se aprecia la presencia de tejido osteoide; d) tinción de Masson a 15 aumentos, formación de tejido osteoide; e) tinción de hematoxilina-eosina a 7 aumentos, se aprecia el crecimiento óseo en la cortical opuesta al implante; f) tinción de Masson a 30 aumentos, se observa el crecimiento perióstico y la cortical.

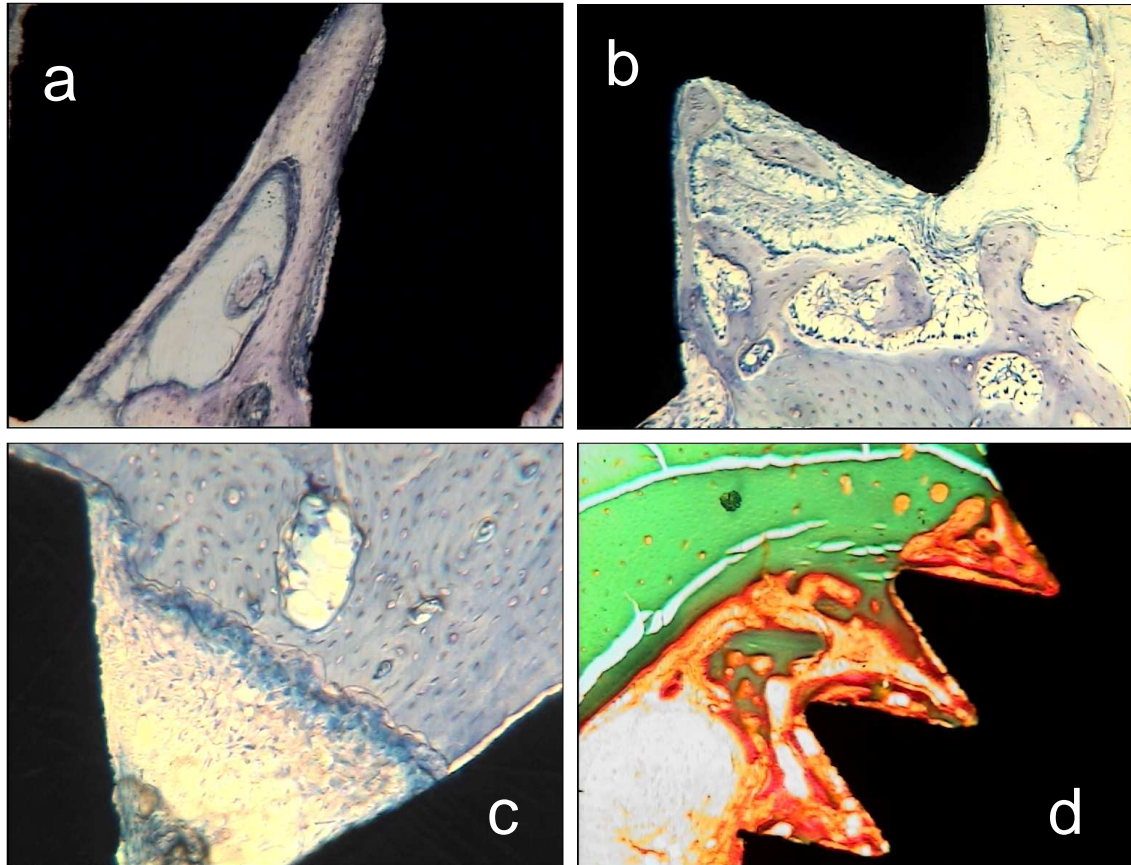


Fig 36. COMPARACIÓN DE GRUPOS DE ESTUDIO, MO a) INTACTO/CONTROL Tinción de azul de toluidina a 60 aumentos. Se observan las características propias del crecimiento normal del hueso, con osteointegración normal, con poco estímulo. Hay menor respuesta de formación ósea, con menos osteoblastos y la velocidad de formación es menor; b) INTACTO/GH, tinción de azul de toluidina a 60 aumentos: se observa la línea de osteoblastos en la zona de osteointegración, aquí se aprecia mayor estímulo óseo, con más actividad, crecimiento y número de osteoblastos, así como más espacio de osteoide que en a); c) OVX/CONTROL: tinción de azul de toluidina a 100 aumentos, se aprecia menor osteointegración que en las anteriores, apreciándose la línea de osteoblastos después del frente de osteoclastos (borde festoneado); d) OVX/GH, tinción de Masson a 25 aumentos, se observa la osteointegración en los valles de las espiras del implante y mayor cantidad de tejido osteoide que en el grupo INTACTO/CONTROL.

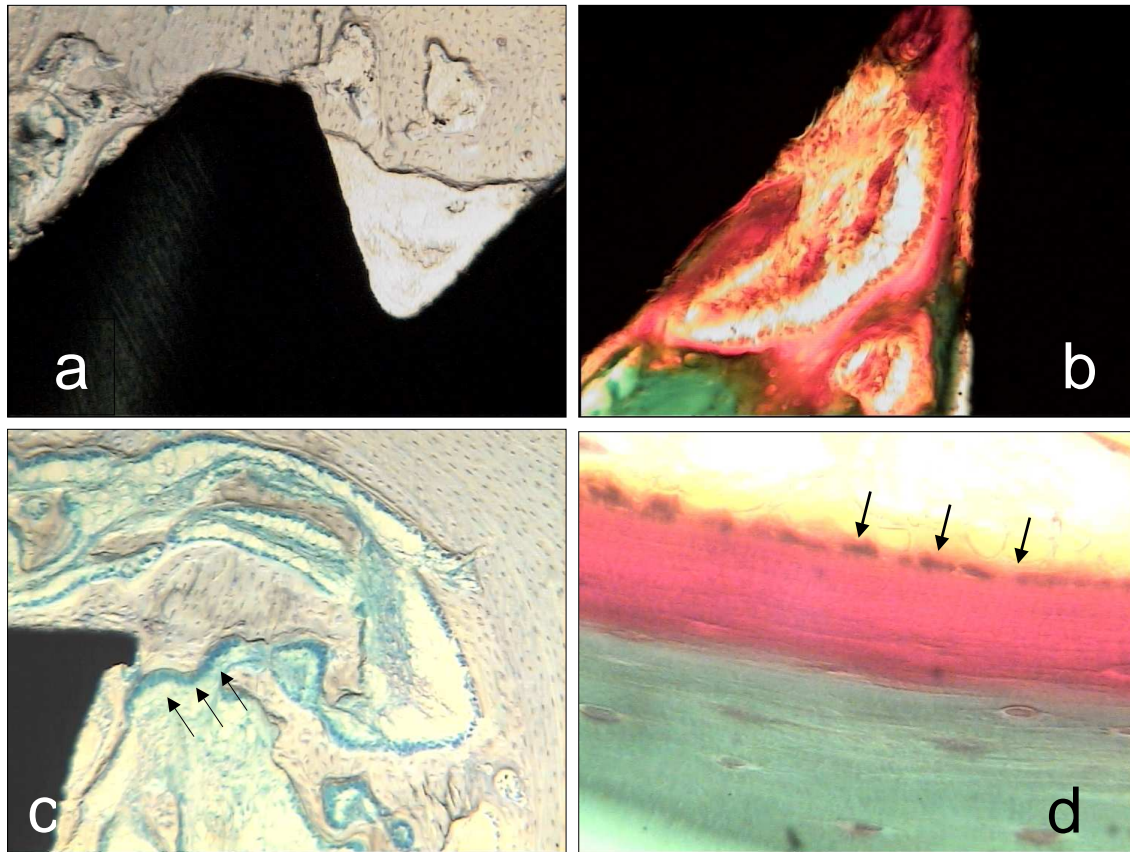


Fig. 37 OVX/CONTROL MO. A) Tinción de azul de toluidina a 60 aumentos, no se observa penetración del hueso en las espiras, no hay crecimiento dentro del valle, en contra de lo que sucede en la imagen b) de la figura anterior; b) tinción de Masson a 100 aumentos, cuando se osteointegra algo, es poco y con tejido osteoide. Se ve el frente de osteoblastos justo al lado del tejido osteoide; c) tinción de azul de toluidina a 60 aumentos, se aprecia actividad osteoblástica alrededor del implante (frente de osteoblastos); d) tinción de Masson a 400 aumentos, se distingue el tejido osteoide, con las células osteoblásticas en empalizada (rojo) y debajo el hueso maduro (verde).

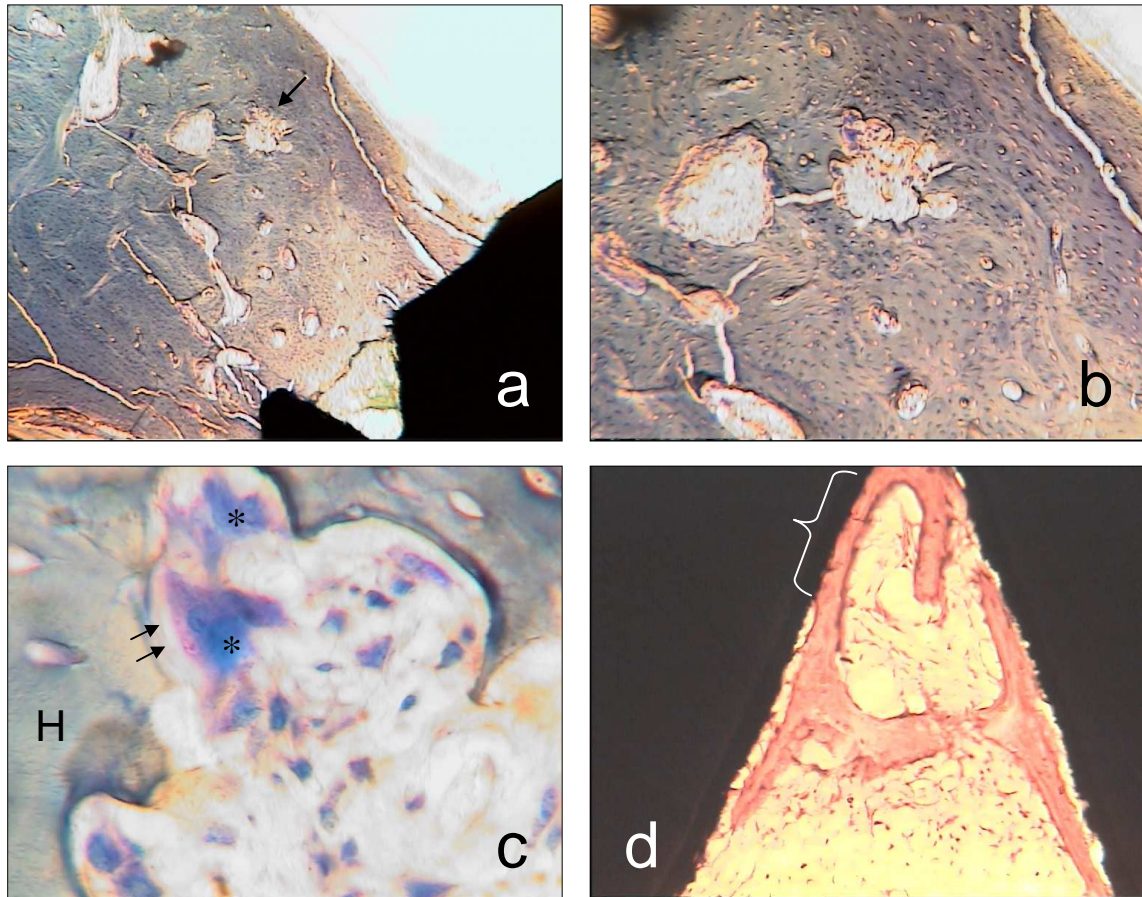


Fig. 38: OVX-GH MO: a) Tinción de azul de toluidina a 25 aumentos, se aprecia un ligerísimo grado de reabsorción en la cortical periimplantaria que no se observa en el grupo sin GH (flecha); b) detalle de a) a 60 aumentos, zona de reabsorción en la cortical; c) detalle de a) a 400 aumentos, se observan varios osteoclastos y se aprecia el borde festoneado (flechas): H = hueso, * = osteoclasto; d) tinción de hematoxilina-eosina a 100 aumentos, se aprecian trabéculas de hueso íntimamente unidas al implante (osteointegración) (llave).

5.2.2. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

La observación de las muestras mediante el MIP-4 proporcionó los siguientes datos del *BIC* (Tabla XVI y Fig. 39):

Tabla XVI. Variaciones del <i>BIC</i> en los distintos grupos de estudio.				
	OVX		INTACTO	
	GH	CONTROL	GH	CONTROL
	36,13 \pm 9,86	22,58 \pm 7,25	28,90 \pm 7,49	34,89 \pm 4,69

Los datos se muestran como media \pm D.S.

El *BIC* se expresa en porcentaje.

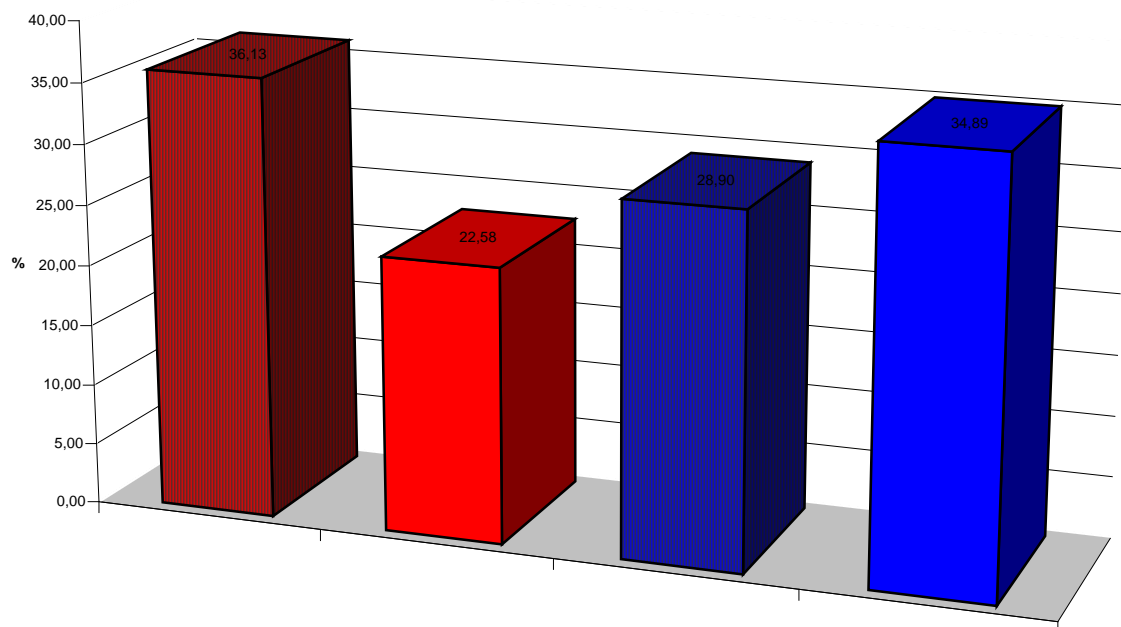


Fig. 39. Representación gráfica de las medias del *BIC* en los distintos grupos de estudio.

En primer lugar se estudió si el factor TIBIA era determinante en los resultados. Para ello se utilizó el test de muestras pareadas, para comparar los datos de las tibias derecha e izquierda. Los resultados demostraron que no existían diferencias significativas, por lo que se procedió a utilizarlos de forma conjunta.

Los datos morfométricos se analizaron mediante el test de ANOVA multifactorial, estudiando como variable el *BIC*, y como factores la ovariectomía (OVX), la aplicación del tratamiento (GH) y la tibia. Se aplica la siguiente fórmula:

$$y_{ijkp} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkp}$$

El *BIC* (y_{ijkp}) es igual a la media global (μ) más el efecto de la GH (α_i), más el efecto de la ovariectomía (β_j), más el efecto de la tibia (γ_k), más las interacciones entre estos factores [$(\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk}$], más el error estadístico (ε_{ijkp}).

Los resultados muestran que los efectos principales de los tres factores no son significativos sobre el *BIC*, ni tampoco son significativos los efectos de las interacciones entre los factores, excepto en la interacción de la ovariectomía y del tratamiento con GH que tiene un efecto estadísticamente significativo sobre *BIC* con un $p = 0,0024 < 0,05$, por lo que resulta muy significativo (Tabla XVII).

Tabla XVII.
Análisis la Varianza Multifactorial para el porcentaje de osteointegración. Suma de cuadrados

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:GH	91,0257	1	91,0257	1,60	0,2190
B:OVX	57,3014	1	57,3014	1,01	0,3265
C:TIBIA	12,7889	1	12,7889	0,22	0,6402
INTERACCIONES					
AB	663,052	1	663,052	11,63	0,0024
AC	83,0924	1	83,0924	1,46	0,2396
BC	30,6956	1	30,6956	0,54	0,4705
ABC	188,493	1	188,493	3,31	0,0821
RESIDUAL	1311,22	23	57,0095		
TOTAL (CORREGIDO)	2452,04	30			

Todos los F-ratios están basados en el error del cuadrado medio residual.

Por tanto, el modelo anterior se puede simplificar y aplicamos el modelo de reducción (Tabla XVIII), relacionando el *BIC* con los factores predictivos: tratamiento con GH y ovariectomía:

$$y_{ijkp} = \mu + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijkp}$$

El *BIC* (y_{ijkp}) es igual a la media global (μ) más el efecto de interacción entre la ovariectomía y la GH ($(\alpha\beta)_{ij}$), más el error estadístico (ε_{ijkp}).

Encontramos que el p-valor es inferior a 0,01 ($p = 0,0033$; error estándar del estadístico = 7,9), por lo que se puede decir que existe una **relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de osteointegración y la interacción entre las variables predictivas (GH y ovariectomía)** (Tablas XVIII y XIX; Fig. 40).

Tabla XVIII. Modelos Lineales Generales para el BIC

Número de variables dependientes: 1
 Número de factores categóricos: 2
 Número de factores cuantitativos: 0

Análisis de la Varianza para %OSTEO

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	641,145	1	641,145	10,27	0,0033
Residual	1810,89	29	62,4445		
Total (Corr.)	2452,04	30			

Estadísticamente significativo = $p < 0,01$

Error Estándar del Est. = 7,90218

Interacciones e Intervalos LSD del 95,0 %

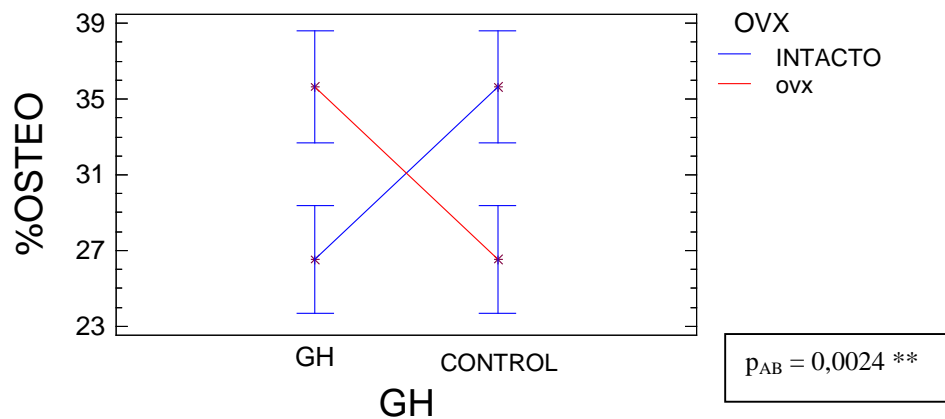


Fig. 40: Porcentaje de osteointegración en el grupo de conejas ovariectomizadas. Se representan las medias y el 95 % de intervalo de confianza, ** $p < 0,01$

Tabla XIX.
Menores Cuadrados Medios para %OSTEO con Intervalos de Confianza del 95,0 por ciento.

Nivel	Contaje	Media	Error Estand.	Límite Inferior	Límite Superior
GRAN MEDIA	31	31,0839	1,42001	28,1796	33,9881
GH por OVX					
GH no ovx	10	26,5338	1,97555	22,4933	30,5742
GH ovx	9	35,634	2,04033	31,461	39,807
no no ovx	6	35,634	2,04033	31,461	39,807
no ovx	6	26,5338	1,97555	22,4933	30,5742

El gráfico de la figura 40 muestra el efecto de la interacción de los factores OVX y GH, de tal modo que se observa que el tratamiento con **GH aumenta el *BIC* en las conejas ovariectomizadas** con respecto a las no ovariectomizadas y a las CONTROL. También se aprecia que la no aplicación del tratamiento, se traduce en más *BIC* en el grupo INTACTOS, siendo el *BIC* menor si hay OVX o si se aplica la GH. Por tanto, en la **osteoporosis experimental la aplicación de 2 U.I. de rhGH mejora significativamente ($p < 0,01$) el *BIC* a los 15 días** y en las conejas sanas la aplicación de esta dosis de la hormona no parece tener un efecto positivo (disminuye el *BIC*).

Al realizar las preparaciones, las muestras correspondientes a la tibia izquierda de la coneja nº 7 se estropearon, por lo que no obtuvimos valores del porcentaje de osteointegración. El modelo estadístico realiza una predicción automática adjudicándole el valor que debería tener (Tabla XX).

Tabla XX. Residuos Inusuales para %OSTEO				
Fila	Y	Y Predicha	Residual	Residual Estudentizado
7	20,21	35,634	-15,424	-2,14

Los resultados del análisis morfométrico corroboran nuestra hipótesis de trabajo: la aplicación de 2 U.I. de GH en el lecho quirúrgico de un implante de titanio colocado en tibia de conejas ovariectomizadas mejora de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$) el porcentaje de osteointegración alrededor de la fijación, a los 15 días de su implantación.

5.2.3. ANÁLISIS mediante DEXA

Se realizó el **análisis densitométrico** de las regiones definidas (Fig. 21) en todas las tibias.

De nuevo se evaluó si el factor TIBIA era determinante en los resultados. Con el test de muestras pareadas se compararon los datos de las tibias izquierda y derecha de cada una de las variables a analizar y de cada región. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que los datos de las tibias se utilizaron de forma conjunta, excepto en el área de la región 1/9 que se estudió analizando las áreas de las tibias derecha e izquierda por separado.

Se aplicó el test de ANOVA multifactorial estudiando en cada una de las regiones definidas las variables DMO, CMO, y ÁREA, siendo de nuevo los posibles factores influyentes: la ovariectomía (OVX), la aplicación de hormona del crecimiento (GH), y la tibia donde se situó el implante (TIBIA derecha o izquierda). La tabla XXI muestra tanto los efectos principales como las interacciones dobles y triples (Tabla XXI).

En la regiones **TOTAL y 1/3**, no se encontraron diferencias significativas en la DMO, en el CMO, ni en el ÁREA entre los distintos grupos de estudio.

A medida que nos acercamos a la región donde se colocó el implante, vamos encontrando valores de P significativos. En la región **1/9** observamos que el factor OVX tiene un efecto estadísticamente significativo ($p = 0,04$) sobre el contenido mineral óseo, disminuyendo en el grupo ovariectomizado, pero sin relación con la GH.

En la región **LATERAL** no existen diferencias estadísticamente significativas, aunque sí se puede hablar de una fuerte tendencia ($p = 0,053$) a disminuir el ÁREA en el grupo que recibió el tratamiento con GH. Las interacciones entre los factores tampoco tienen significación estadística.

Tabla XXI. Análisis mediante DEXA (Valores de P para el test de ANOVA Multifactorial)						
REGIÓN	Variable de respuesta	FACTORES PRINCIPALES			INTERACCIONES	COMENTARIO
		OVX	GH	TIBIA		
TOTAL	DMO	-	-	-	-	
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	-	-	-	
1/3	DMO	-	-	-	-	
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	-	-	-	
1/9	DMO	-	-	-	-	
	CMO	↓0,04*	-	-	-	
	ÁREA	-	-	-	-	
LATERAL	DMO	-	-	-	-	
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	↓0,053	-	-	
SUMA	DMO	↓0,051	-	-	↓0,003** (OVX-GH-TIBIA)	↓ DMO en OVX, GH y TIBIA izquierda
	CMO	↑0,08	↑0,01**	-	↑0,03* (OVX-GH)	
	ÁREA	↑0,01**	↑0,02*	-	↑0,02* (OVX-GH-TIBIA)	
IMPLANTE	DMO	↓0,005**	-	-	-	
	CMO	↑0,01**	↑0,04*	-	↑0,08 (OVX-GH)	↓ DMO en OVX
	ÁREA	↑0,008**	-	-	-	
ALREDEDOR	DMO	↓0,01**	-	-	↓0,001* (OVX-GH-TIBIA)	↓ DMO en OVX, GH y TIBIA izquierda
	CMO	-	-	-	-	
	ÁREA	-	↑0,056	-	↑0,02* (OVX-GH-TIBIA)	
Valores en negrita = estadísticamente significativo : * p < 0,05; ** p < 0,01						
(-) = No significativo						
↑ ó ↓ = efecto positivo o negativo						

En la región definida como **SUMA**, comienzan a aparecer resultados significativos. Aparece una fuerte tendencia al descenso de la densidad en el grupo OVX ($p = 0,051$) y la interacción de los tres factores tiene un efecto altamente significativo ($p = 0,0033$), produciéndose una disminución de la DMO asociada a OVX, GH y tibia IZQUIERDA. El CMO aumenta de forma estadísticamente significativa en el grupo GH y hay una tendencia a aumentar en el grupo OVX ($p = 0,08$); la interacción de ambos factores es altamente significativa ($p = 0,03$). El aumento del ÁREA es estadísticamente significativo en el grupo OVX ($p = 0,01$) y en el grupo GH ($p = 0,02$), existiendo una interacción significativa entre los tres factores ($p = 0,02$).

Si nos acercamos todavía más a la herida quirúrgica, justo en las inmediaciones de la misma y en la región definida como **IMPLANTE**, encontramos valores de P significativos: disminución de la DMO ($p = 0,005$) en el grupo OVX frente al INTACTO, aumento del CMO tanto en el grupo OVX ($p = 0,01$), como en el grupo GH ($p = 0,04$) e incremento del ÁREA en el grupo OVX ($p = 0,008$).

Para ver la influencia en las inmediaciones del implante, descontando la zona de la fijación, se definió la región **ALREDEDOR**, donde se observa un descenso en la DMO ($p = 0,01$) en el grupo OVX (Fig. 41); la interacción de los tres factores tiene un efecto estadísticamente significativa ($p = 0,001$) sobre la densidad, que disminuye en la tibia. No hay diferencias en el CMO, ni en el ÁREA, (aunque sí una tendencia: $p = 0,056$), pero sí que la interacción de los tres factores afecta al ÁREA ($p = 0,02$), haciendo que aumente en el grupo tratado con GH, OVX, y en la tibia izquierda.

En general, se observa una disminución de la densidad mineral ósea (muy significativa en la región IMPLANTE) en los grupos ovariectomizados y cuando se produce la interacción de los factores “OVX”, “GH” y “TIBIA IZQDA.”. Esto quiere decir que el factor ovariectomía produce una disminución de la densidad y que la aplicación de GH en el grupo OVX hace que haya menor densidad.

Los resultados morfométricos y densitométricos, aunque aparentemente contradictorios, sí se corresponden, ya que se encuentra menor DMO justamente en el grupo en el que se aprecia mayor *BIC*, puesto que según el análisis histológico, la GH mejora la actividad osteogénica en el grupo OVX, aumentando la presencia de tejido neoformado alrededor del implante, a los 15 días en los grupos OVX y GH (Fig. 42, 43 y 44).

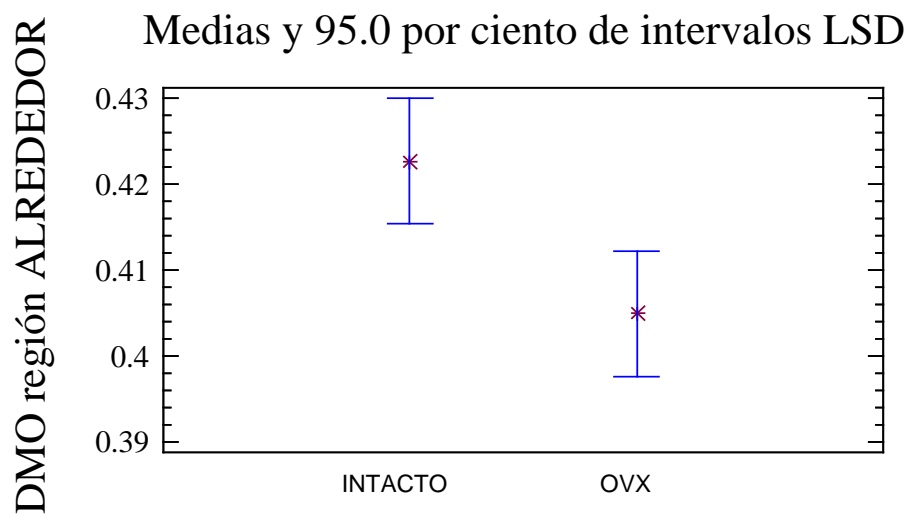


Fig. 41: Densidad mineral ósea alrededor del implante en el grupo de conejas tratadas con GH. Se representan las medias y el 95 % de intervalo de confianza. $P = 0,01$.

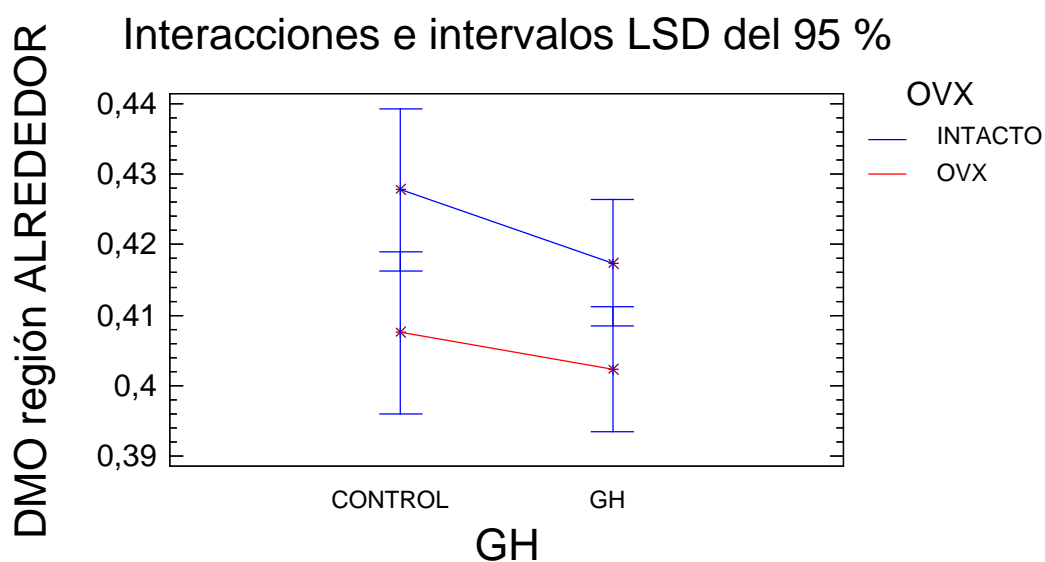


Fig. 42: Densidad mineral ósea alrededor del implante. Se representa la interacción de los factores GH y OVX, las medias y el 95 % de intervalo de confianza.

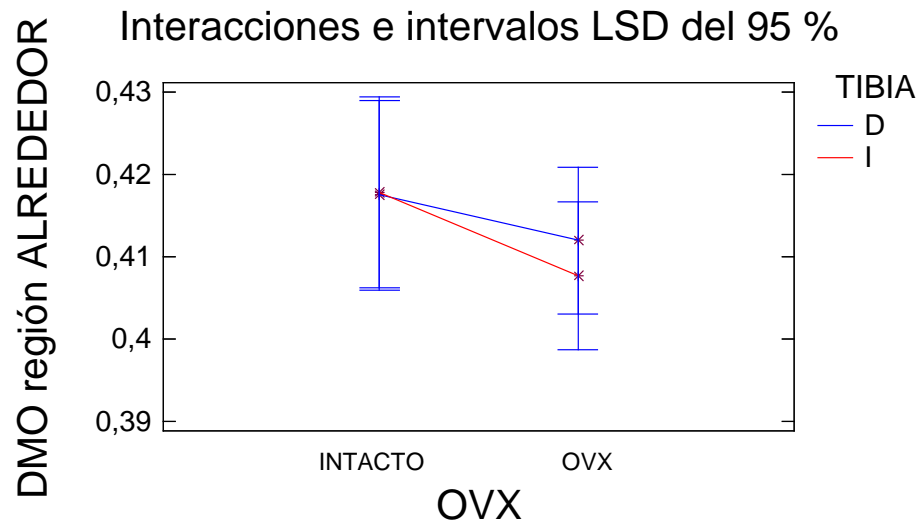


Fig. 43: Densidad mineral ósea alrededor del implante. Se representa la interacción de los factores OVX y TIBIA, las medias y el 95 % de intervalo de confianza.

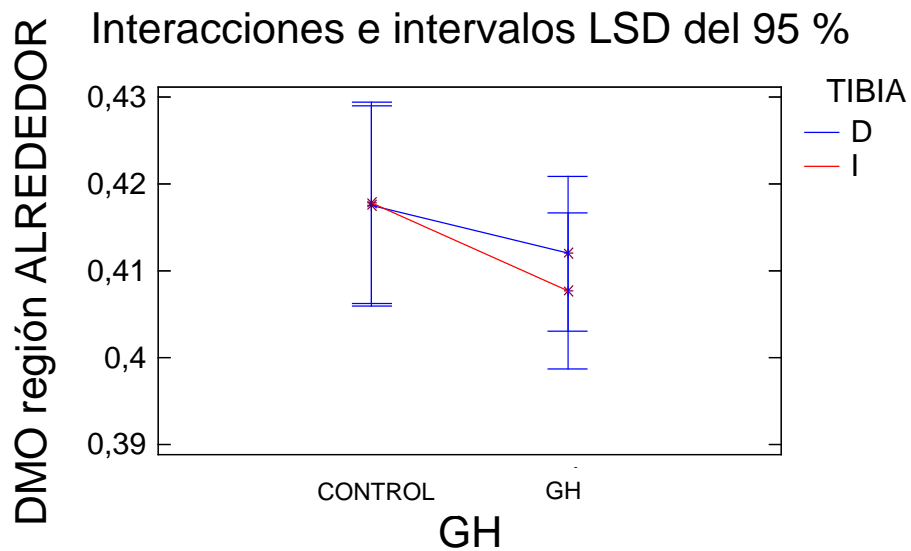


Fig. 44: Densidad mineral ósea alrededor del implante. Se representa la interacción de los factores GH y TIBIA, las medias y el 95 % de intervalo de confianza.

6. DISCUSIÓN

Para el conocimiento profundo de los procesos regenerativos que suceden en los maxilares al aplicar distintos tratamientos y en particular, en las situaciones de déficit óseo, es importante disponer en Odontología de un modelo de osteopenia experimental fiable en el que se puedan investigar el diseño y uso de distintos dispositivos de regeneración (p.e. implantes dentales, distractores óseos, sustitutos de injertos óseos, etc.) así como sus características biológicas y biomecánicas, en el que se puedan obtener unos resultados extrapolables a la clínica diaria. La elección cuidadosa de un modelo de experimentación animal adecuado para el estudio de la osteoporosis minimiza las limitaciones asociadas con el estudio de la enfermedad en humanos, permitiendo utilizar un gran número de animales y manteniendo el control del experimento en todo momento (Newman *et al.*, 1995).

Los resultados de nuestro estudio demuestran que la combinación de ovariectomía más dieta hipocálcica induce una rápida disminución de la DMO (a las seis semanas), medida mediante DEXA, siendo muy significativa en CALOTA y COLUMNA cervical ($p < 0,01$) y presentando una fuerte tendencia en la TIBIA de la coneja, consiguiendo una rápida osteoporosis experimental.

Otros autores también han logrado inducir osteoporosis en animales de laboratorio. Existen distintos modelos de osteoporosis experimental, que varían según el animal de experimentación utilizado, la forma de conseguir la osteoporosis experimental y las distintas herramientas para analizar la osteoporosis.

El modelo experimental de osteoporosis en **roedores** es el más usado y tiene múltiples ventajas: no son caros, son fáciles de alojar y se pueden utilizar cepas genéticamente alteradas. Por su vida media corta, permite estudiar las alteraciones de la edad (Duarte *et al.*, 2005). Como se han utilizado en tantos estudios, se conoce bastante sobre su *turn over* óseo (Ortoft y Oxlund, 1996) y sobre los efectos de la dieta en el hueso.

Se ha constatado adelgazamiento de la cortical e incremento de la fragilidad ósea con el envejecimiento en ratas. Aunque los roedores no experimentan menopausia natural, la ovariectomía sí produce menopausia artificial.

La **coneja** ovariectomizada se ha usado ampliamente como modelo de osteoporosis postmenopáusica, puesto que la osteopenia que se produce tras la extirpación ovárica es muy similar a la que sucede en los humanos (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Mori *et al.*, 1997), tanto en la tibia como en la mandíbula (Cao *et al.*, 2001, 2004). En concreto, el conejo Nueva Zelanda posee un *turn over* más rápido que el de los primates, y en contra de lo que sucede en otros mamíferos de pequeño tamaño como la rata, el ratón o el cobaya, los conejos alcanzan la madurez esquelética (cierre de las placas de crecimiento) poco tiempo después de completar el desarrollo sexual aproximadamente a los 6 meses. Es fácil de alojar, barato y manejable (Newman *et al.*, 1995) y se pueden obtener cepas genéticamente homogéneas.

Su tamaño relativamente pequeño impide la experimentación de prótesis ortopédicas, pero presentan un tamaño aceptable para la investigación de implantes dentales pequeños en el fémur, la tibia y la mandíbula (Turner 2001).

Lo ideal sería utilizar conejas viejas, que además de que resultan más económicas, no es necesario realizarles la ovariectomía para conseguir la osteoporosis, pero debido a la gran mortalidad asociada a la administración de anestesia general que presenta este grupo de edad, hace que resulte poco útil para este tipo de estudio (Tresguerres, 1999).

La **rata** ovariectomizada (OVX) es sin duda el animal más utilizado en los estudios sobre la patofisiología, diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis (Fini *et al.*, 2004; Namkung-Matthai *et al.*, 2001; Ortoft y Oxlund, 1996; Duarte *et al.*, 2005).

Pero aunque los estudios sobre animales pequeños como la rata son correctos desde un punto de vista científico y ético, y son aceptables en las primeras fases de investigación, el problema surge precisamente por su pequeño tamaño, que obliga a utilizar implantes miniaturizados diferentes de los usados en clínica, además de que la calidad ósea de la rata difiere bastante de la del hombre (ausencia de sistema haversiano en los animales jóvenes y alteraciones de la función osteoblástica en las últimas etapas de la deprivación estrogénica) (Turner 2001). Por todo ello es necesario adoptar un modelo animal con un nivel filogenético superior, ya sean conejos, minicerdos, ovejas, gatos, perros o monos.

El **cobaya** es uno de los mamíferos más populares en el mundo de la investigación gracias a su ciclo reproductivo. Al igual que el hombre, este animal tiene un ciclo de ovulación largo y espontáneo y posee un cuerpo lúteo secretor activo. Son más fáciles de alojar y más baratos que los modelos más grandes. Por su tamaño, es posible el estudio de prótesis humanas y la obtención de muestras de sangre y biópsicas de tamaño grande.

Pero parece ser que la deficiencia estrogénica no tiene consecuencias sobre la masa ósea de estos animales, por lo que no se presentan como un modelo adecuado para el estudio de la osteoporosis (Newman *et al.*, 1995).

La introducción del **minicerdo** eliminó los problemas relacionados con el gran tamaño del cerdo de granja (Akahoshi *et al.*, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2003). Aunque son más caros, al tener menor tamaño también se necesita menos espacio para alojarlos y son más fáciles de manejar. Su metabolismo óseo, su ciclo reproductivo y su función gastrointestinal similares a las del hombre son características muy positivas a la hora de valorar este modelo animal, sin embargo, su coste y la dificultad de adquirirlos en algunas zonas se presentan como desventajas (Newman *et al.*, 1995).

El **gato** no se ha utilizado mucho en la investigación, sin embargo, es fácil inducir osteopenia en los gatos en crecimiento mediante dieta pobre en calcio o alta en fósforo, o tras una larga inmovilización. Son fáciles de manejar y de alojar.

En contra de este modelo, encontramos que no parece haber relación entre la ganancia de edad y la pérdida de hueso, ni entre la ovariectomía y las fracturas espontáneas, lo que invalida en parte a este animal como modelo de osteoporosis. No hay que olvidar tampoco el vínculo afectivo que se puede establecer con estos animales, ya que son usados como mascotas (Newman *et al.*, 1995).

El modelo canino presenta una ventaja importante y es que posee sistema haversiano del hueso cortical y remodelado de los huesos cortical y trabecular similar al humano. Los **perros** son menos caros que los monos, por ejemplo, y es más fácil trabajar con ellos. Además, al ser monogástricos, el estudio de la absorción de los fármacos se asemeja más al del humano que en otros modelos animales.

Sin embargo, las desventajas también son claras: la perra ovula sólo dos veces al año y la extirpación de los ovarios y el útero no parece suficiente para producir pérdida ósea ni causar la aparición de fracturas espontáneas. Finalmente, el vínculo emocional que une al hombre con el perro dificulta su utilización como modelo experimental (Newman *et al.*, 1995).

Hay pocos estudios que utilicen la **oveja** para el estudio de la osteopenia, y que aunque son más grandes que los animales vistos previamente, son muy dóciles y sufren menos estrés cuando están en grupo, pudiendo vivir al aire libre con una mínima supervisión, lo que también reduce costes, además, son animales fáciles de adquirir. La

disminución del volumen óseo en la cresta iliaca y en la mandíbula relacionada con la edad o con la ovariectomía se asemeja bastante a la que se produce en la osteoporosis postmenopáusica de la mujer, por lo que parece un modelo prometedor en este campo; además, los perfiles hormonales son muy similares a los del humano.

El modelo ovino ofrece muchas ventajas gracias a su gran tamaño y debido a sus características óseas, es un buen prototipo para el estudio de biomateriales y prótesis (Bellino 2000; Newman *et al.*, 1995), pero presenta una serie de desventajas importantes: en primer lugar parece ser que existen fluctuaciones en la masa ósea relacionadas con las estaciones del año; no poseen una etapa menopáusica donde se acelere la pérdida ósea, y para conseguir osteoporosis tras la ovariectomía se necesita un periodo de tiempo de entre 12 y 24 meses; por otro lado, debido a las diferencias tan grandes que existen entre su sistema gastrointestinal y el humano, el estudio de fármacos por vía oral no puede ser evaluado correctamente; también el metabolismo del fósforo es distinto y el hueso de la oveja joven es plexiforme y sólo se aprecia remodelación haversiana a partir de los 7-9 años. Parece un modelo prometedor, pero son necesarios más trabajos para determinar sus posibilidades (Turner 2001; Newman *et al.*, 1995).

El **hurón** es un modelo de osteoporosis relativamente nuevo. Posee sistema haversiano y presenta pérdida ósea en la tibia proximal tras la ovariectomía. Es fácil de alojar, pequeño y tiene ovulación con las estaciones. Son carnívoros, lo que afecta al estudio del metabolismo de los fármacos y son demasiado pequeños para el estudio de implantes en el hueso osteopénico (Turner 2001).

Los estudios de osteopenia en **primates** no humanos (Mann *et al.*, 1992) presentan muchas ventajas sobre otros modelos de osteoporosis, ya que los órganos internos del

mono son muy similares a los del hombre. El ciclo y los patrones hormonales de, por ejemplo, la mona macaco, son muy parecidos a los de la mujer. El hueso responde de forma similar al cese de la función ovárica (Newman *et al.*, 1995, Turner 2001). Sin embargo, la menopausia sucede pasados los veinte años, por lo que el animal experimental debe ser suficientemente mayor como para ser útil en el estudio de la osteoporosis, lo que es difícil y costoso. El pico de masa ósea no se alcanza hasta los 9 años en, por ejemplo, el mono *cynomolgus* (Chen *et al.*, 2000), por lo que los trabajos con monas ovariectomizadas no deberían realizarse antes de esta edad. Su adquisición, mantenimiento y manejo suelen ser complicados, y pueden ser transmisores de enfermedades al hombre (Turner, 2001). Las estipulaciones legales y medioambientales de alojamiento son otro factor a tener en cuenta. El mono debería usarse en este caso como último escalón antes de comenzar los ensayos clínicos en humanos.

Por todo lo dicho, hemos considerado que el modelo de coneja ovariectomizada más dieta hipocálcica presenta muchas ventajas con respecto a los otros prototipos experimentales: es un modelo de osteoporosis en un adulto, se puede conseguir una disminución significativa de la DMO en un periodo breve de tiempo, el conejo posee una masa ósea adecuada para la colocación de implantes dentales y este animal es fácil de obtener y de cuidar. A esto hay que sumar que es útil para investigar los agentes anabólicos ya que tiene un *turn over* óseo rápido con predominio del remodelado sobre el proceso de modelado (Castañeda *et al.*, 2006).

La osteoporosis se ha inducido en animales de laboratorio aplicando diferentes métodos: **administración de corticosteroides, denervación, inmovilización, ausencia de gravedad, y ovariectomía bilateral asociada o no a dieta hipocálcica** (Fujimoto *et al.*,

1998; Turner 2001; Mori *et al.*, 1997). Este último método es el que mejor reproduce la situación clínica de osteoporosis post-menopáusica y conlleva el desarrollo de una osteoporosis sistémica tanto en el esqueleto axial como en el periférico.

Los modelos animales de osteoporosis se pueden clasificar en dos grandes grupos (Fini *et al.*, 2004; Turner 2001; Newman *et al.*, 1995): aquellos en los que el mecanismo principal es el aumento de reabsorción, p.e. ovariectomía con o sin dieta hipocálcica (Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005; Mori *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2001, 2004; Newman *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 2005; Lugero 2000; Namkung-Matthai *et al.*, 2001;) y los modelos en los que el déficit de formación es lo que prevalece, p.e. administración de corticoides (Ortoft y Oxlund, 1996), animales seniles (Duarte *et al.*, 2005); o la combinación de ambos mecanismos (Castañeda *et al.*, 2006; Mann *et al.*, 1992; Duarte *et al.*, 2005).

La administración de corticosteroides y la ovariectomía son los principales modelos de osteoporosis experimental descritos en conejos (Castañeda *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2001, 2004; Fujimoto *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005; Mori *et al.*, 1997), pero la inducción de la enfermedad mediante ovariectomía asociada a la dieta hipocálcica en conejos ha sido menos estudiada (Mori *et al.*, 1997; Tresguerres *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005).

La disminución de las hormonas sexuales en la menopausia (fundamentalmente los estrógenos) alteran los reguladores naturales de la masa ósea. Los estrógenos actúan como mitógenos de los OB, aumentando la expresión de AP y de colágeno tipo I (Majeska *et al.*, 1994; Zang *et al.*, 1994) así como los receptores de vitamina D (Ettinger *et al.*, 1999), de GH (Ishibe *et al.*, 1995) y de progesterona (Slootweg *et al.*, 1997); modulan la respuesta a la PTH en las células osteoblásticas (Ernst *et al.*, 1989; Fukayama y Tashjian, 1989) y

aumentan la expresión de IGFBP4 y disminuyen su *breakdown* proteolítica. La acción de preservar hueso de los estrógenos es mediada fundamentalmente a través de los efectos sobre el número y la actividad de los OC (actividad resortiva *per se* y sobre la vida media de la célula). En los OC, los niveles de receptores estrogénicos son generalmente bajos, por lo que la disminución del número de OC está posiblemente modulada por la producción de citoquinas por parte de las células osteoclastogénicas en el microambiente óseo más que por efectos directos sobre los OC: p.e. la expresión de factor inhibidor de la osteoclastogénesis está inducida por estrógenos (Hofbauer *et al.*, 1999; Kong y Penninger, 2000). Sin embargo, en estudios *in vitro* sobre cultivos de OC se ha visto una disminución inducida por estrógenos en la expresión de mRNAs y en la secreción de varias enzimas lisosómicas (catepsinas L y K y β glucuronidasa) (Kremer *et al.*, 1995; Oursler *et al.*, 1993). Los cambios en la actividad osteoclástica están probablemente mediados vía apoptosis. En roedores OVX se ha demostrado un aumento en la proliferación y diferenciación de los precursores de OC (Jilka *et al.*, 1995 y 1992), aumento del número de células estromales/osteoblásticas (Jilka *et al.*, 19998; Kimble *et al.*, 1996) y disminución de la apoptosis osteoclástica. En mujeres postmenopáusicas se ha demostrado aumento en la producción de IL-1, GM-CSF y TNF- α y en ratones OVX se ha demostrado un aumento de IL-6 (Hughes *et al.*, 1996). Por tanto, la disminución o eliminación de la función ovárica lleva al declive de los niveles estrogénicos, por ello los animales OVX, en nuestro caso la coneja Nueva Zelanda, tienen alterados los reguladores de la masa ósea, provocando la pérdida de tejido óseo, que conlleva fragilidad ósea, artritis, fracturas, etc.

Para la medición de la DMO *in vivo* mediante DEXA hemos utilizado el aparato NORLAND XR-26 ® (versión 2.3).

La **medida de la densidad mineral ósea** mediante el análisis con absorciometría dual fotónica de rayos X (DEXA) es una herramienta de gran precisión superior a otros

procedimientos no invasivos basados en la atenuación de la emisión de rayos γ , rayos X o ultrasonidos cuantitativos (Guglielmi, 1995; Lang *et al.*, 1991; Faulkner *et al.*, 1991). Sin embargo, aunque ya están disponibles otros métodos capaces de realizar una reconstrucción tridimensional de los parámetros óseos, tales como la tomografía computarizada cuantitativa o tomografía computarizada microscópica, no están ampliamente disponibles y son necesarios más estudios sobre la determinación densitométrica en modelos animales, especialmente cuando se evalúan estructuras anatómicas complejas o nuevas áreas anatómicas tales como el hueso cortical y el subcondral (Schmidt *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2001; Veitch *et al.*, 2004). Estudios comparativos han demostrado una excelente correlación en las medidas *in vivo* e *in vitro* de la masa ósea entre las distintas generaciones de sistemas DEXA (Faulkner *et al.*, 1991, 1993; Dal Mas *et al.*, 2002), y en concreto mediante el densitómetro Norland XR-26 ® (versión 2.3) que se ha utilizado en nuestro trabajo (Hagiwara *et al.*, 1993; Sievänen *et al.*, 1994).

Otros trabajos también han utilizado este mismo aparato, o una versión mejorada (Norland XR-36; Sievänen *et al.*, 1994) en animales pequeños *in vitro*, como en fémur de rata (Petersen *et al.*, 2000; Hagiwara *et al.*, 1993) o en varias localizaciones del miembro posterior (Sievänen *et al.*, 1994). En los estudios *in vivo* con versiones mejoradas de este densitómetro se ha medido la DMO en espina lumbar y cuello femoral de monos (Hotchkiss, 1999) y en tibia y húmero de gallinas (Schreiweis *et al.*, 2003). No hemos encontrado autores que describan la utilización *in vivo* de este aparato en un modelo de osteoporosis experimental en coneja, aunque sí con otros densitómetros (Hologic: Castañeda *et al.*, 2006; Norris *et al.*, 2000; QDR-2000: Mori *et al.*, 1997). En nuestro estudio, las regiones escogidas para la medición de la densidad han sido columna cervical, calota y tibia, si bien, la columna lumbar es la localización anatómica habitual para la

medición de las variaciones de la DMO en los modelos experimentales de osteoporosis.

Este trabajo demuestra que la columna cervical y la calota pueden ser también regiones excelentes para este propósito. Aunque en la tibia no encontramos diferencias S.S., sí que se aprecia también una tendencia a disminuir la DMO ($p = 0,1$).

Por otro lado, existe una correlación estadísticamente significativa entre la diferencia de DMO antes y después de la OVX más dieta hipocálcica entre la calota y la columna ($p = 0,01$) y entre la columna y la tibia ($p = 0,19$). Estos datos sugieren que la disminución de densidad acontecida en la columna tras el tratamiento se correlaciona con la de la tibia. Castañeda *et al* (2006) en un modelo de osteoporosis experimental en coneja mediante OVX más corticoides, encontraron correlación de la DMO medida en columna, rodilla y hueso subcondral de tibia, pero no con la de hueso cortical de la metáfisis de la tibia. Probablemente el tipo de hueso de la calota de la coneja es más sensible a este procedimiento de OVX + dieta hipocálcica debido a las diferencias en composición y metabolismos de las regiones óseas estudiadas.

Serían necesarios más estudios basados en técnicas volumétricas o en TC microscópica, lo que ayudaría probablemente a aclarar la estructura ósea de la tibia, aunque algunos autores aconsejan precaución con estos nuevos métodos a la hora de valorar la densidad cortical del hueso metafisario (Veitch *et al.*, 2004) por posibles errores de medición.

El modelo de osteoporosis experimental ha sido muy útil para el estudio de la pérdida ósea postmenopáusica y para dilucidar el proceso de reparación alrededor de los implantes. La inserción de una fijación de titanio en la tibia de conejos es un modelo experimental validado, donde se ha estudiado la interfase hueso-implante, equiparando los resultados obtenidos con los de los implantes intraorales. En nuestro trabajo, para valorar si la presencia de osteoporosis (inducida por OVX + dieta hipocálcica) y la aplicación local de 2 U.I. de rhGH en el lecho quirúrgico del implante afectaban de alguna manera a la integración de las fijaciones roscadas de titanio con superficie tratada, se realizó un análisis histológico, histomorfométrico y densitométrico.

El **ANÁLISIS HISTOLÓGICO** muestra que la GH a las dosis utilizadas (2 U.I.) no parece modificar la respuesta en animales sanos, pero sí mejora la actividad ósea en el grupo osteoporótico, ya que, aunque se aprecia algo de reabsorción cortical, predomina la presencia de tejido neoformado con o sin osteoide alrededor del implante. En el grupo OVX-CONTROL, se observa menor crecimiento óseo periimplantario formado fundamentalmente por tejido no calcificado (osteoide) al compararlo con el grupo INTACTO-CONTROL.

Como ya se comentó ampliamente en la introducción, hoy en día está perfectamente documentado que la GH estimula directamente el crecimiento de muchos tejidos (Kassem *et al.*, 1993 y 1994; Russell y Spencer 1985; Barnard *et al.*, 1991; Isgaard *et al.*, 1986; Lewinson *et al.*, 1993; Maor *et al.*, 1989, Green *et al.*, 1985; Stracke *et al.*, 1984), fundamentalmente por el incremento del número de células (Kember y Walker, 1971).

En el hueso, estimula el crecimiento longitudinal de forma directa mediante la estimulación de los precondrocitos en la placa de crecimiento (Kassem *et al.*, 1994),

seguido de una expansión clonal causada tanto por la producción local de IGF-I inducida por GH (Kidder *et al*, 1997; Guler *et al.*, 1988; Russell y Spencer, 1985; Holder *et al.*, 1981), como por el aumento en los niveles circulantes de IGF inducidos por GH. La GH es el determinante más importante para producir la estimulación de las células progenitoras, aunque es posible que IGF-I pueda estimular de alguna manera también la célula progenitora.

In Vitro, induce directamente la formación de hueso (Maor *et al*, 1989), estimula la producción de IGF-I (Maor *et al*, 1989), incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina (Stracke *et al*, 1984), eleva la síntesis de DNA (Maor *et al*, 1989) y aumenta el tamaño del cartílago (Maor *et al*, 1989). Estimula la proliferación de los **osteoblastos** (Kassem *et al*, 1993, 1994; Kassem 1997; Sloodweg *et al*, 1988, 1997) y a veces las funciones diferenciales de estas células, interactuando con las células progenitoras (Kassem *et al*, 1994) e induciendo la expresión de IGF-I (efecto anabólico) en osteoblastos de roedores (Canalis *et al*, 1989; Mohan y Baylink, 1991), pero no está clara esta inducción en los osteoblastos humanos (Chenu *et al*, 1990; Kassem *et al*, 1993). La GH eleva el número de osteoclastos en el hueso metafisario de tibia de rata hipofisectomizada (Lewinson *et al*, 1993), que estimula la reabsorción ósea osteoclástica a través de la acción directa e indirecta sobre la diferenciación osteoclástica, y de forma indirecta sobre la activación de los osteoclastos maduros (Nishiyama *et al.*, 1996) y vía IGF-I e IL-6, sobre la formación osteoclástica (Stracke *et al.*, 1984; Nishiyama *et al.*, 1996; Saggese *et al.*, 1995, Mochizuki *et al.*, 1992, Jilka *et al.*, 1992).

In vivo, la administración sistémica de GH incrementa los niveles circulantes de otras hormonas que tienen influencia sobre el hueso (Goff *et al.*, 1990) y es capaz de estimular la formación ósea mediante la interacción directa con el hueso (Hedner *et al*, 1996; Saban *et al.*, 1996). En animales con GHD la administración de GH aumenta la

formación y la masa ósea (Wright *et al.*, 1995b; Martínez *et al.*, 1996) y en animales con secreción normal de la hormona del crecimiento se evidencia un incremento la masa ósea cortical mediante la inducción de la formación ósea subperióstica y se produce un incremento de la resistencia mecánica de todo el hueso (Jorgensen *et al.*, 1991; Andreassen *et al.*, 1995); ganan peso y se evidencia un aumento del *turn over* óseo (Turner, 1995). Resultados similares se hallan en animales OVX (Andreassen y Oxlund, 1996; Eschen y Anddreassen, 1995). En ratas (Bak *et al.*, 1990; Bak y Andreassen, 1991; Nielsen *et al.*, 1991) y en *minipigs* (Kolbeck *et al.*, 2003; Bail *et al.*, 2002) el tratamiento con GH favorece la formación del callo óseo de fracturas y la resistencia mecánica de los huesos en proceso de curación, mientras que en conejos (Brittberg *et al.*, 1997), la respuesta es mucho más débil.

Es bien sabido que la **hormona del crecimiento** tiene una gran importancia en el crecimiento longitudinal del hueso y que estimula la diferenciación y proliferación de los osteoblastos, pero sus efectos sobre la osteointegración de fijaciones de titanio en situaciones de osteopenia / osteoporosis está muy poco estudiada. La aplicación sistémica de la hormona se ha evaluado ampliamente tanto en animales (Bail *et al.*, 2002; Andreassen y Oxlund, 2000; Mosekilde *et al.*, 1998; Kidder *et al.*, 1997; Verhaeghe *et al.*, 1996; Ortoft y Oxlund, 1996; Mann *et al.*, 1992) como en humanos (Landin-Wilhelmsen *et al.*, 2003; Nilsson, 2000; Wüster *et al.*, 1998; Baum *et al.*, 1996; Thoren *et al.*, 1993) con resultados satisfactorios acelerando la curación de fracturas, distracción ósea, tanto en situaciones de osteopenia y osteoporosis como en déficits de GH.

Algunos autores encuentran mejoría con la aplicación de la GH en situaciones de osteopenia, como Kidder y colaboradores (1997), que al administrar conjuntamente estrógenos y GH subcutánea en ratas ovariectomizadas, observan que ambas hormonas

reducían la osteopenia producida en el hueso esponjoso, si bien el mecanismo de actuación era diferente.

En algunos modelos de rata con osteopenia inducida con glucocorticoides la GH no parece aumentar la masa ósea al administrarla junto con el corticoide, pero en el estudio de Ortoft y Oxlund (1996), los investigadores vieron que en el grupo que había sido tratado sólo con GH aparecía un marcado aumento de la formación ósea y de la mineralización de la superficie perióstica, así como un aumento de la masa cortical (Ortoft y Oxlund, 1996).

En situaciones de reparación ósea, como fracturas u osteotomías de defecto crítico, también la hormona del crecimiento tiene efectos positivos, como en el trabajo de Cacciafesta y colaboradores (2001), en donde se inyectaron 2,7 mg de rhGH/kg/día a ratas a las que se les había practicado un defecto crítico de 5 mm de diámetro en la calota de cada hueso parietal, cubiertos exo y endocranealmente con una membrana de e-PTFE. Los autores constataron a los 28 días mediante test biomecánico el aumento de carga crítica, fuerza crítica y absorción de energía en máxima carga de forma significativa, así como casi el doble de aumento de volumen de hueso neoformado (medido mediante micro-TC) en los defectos comparado con el grupo placebo (Cacciafesta *et al.*, 2001).

En el trabajo de Hedner y colaboradores (Hedner *et al.*, 1996), se aplicó hormona de crecimiento de forma sistémica mantenida e inyectada vía catéter conectado a una mini bomba osmótica, en la proximidad de defectos óseos practicados en mandíbula de rata y cubiertos con membrana de e-PTFE; los autores encontraron que se producía un incremento en la formación ósea en las ratas tratadas con GH local durante 4 semanas, por lo que concluyeron que esta hormona ejercía un efecto local directo, independiente de la IGF-I producida en el hígado, y sugerían que la rhGH podía ser utilizada para estimular la curación y formación óseas junto con membranas de e-PTFE.

En nuestro trabajo valoramos la **aplicación local** de hormona del crecimiento sobre el proceso de osteointegración de un implante de titanio roscado de superficie tratada en la tibia de conejas ovariectomizadas y sometidas a dieta hipocálcica (osteoporosis experimental) y en la tibia de conejas sanas.

La aplicación local de GH durante el acto operatorio incrementa la formación de tejido osteoide y el crecimiento óseo en modelos animales (Guicheux *et al.*, 1998; Downes *et al.*, 1990; Blom *et al.*, 1998; Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005). El “efecto impulso” de la aplicación de GH local produciría una aceleración inicial del remodelado intracortical, empezando por la reabsorción y continuando por la formación ósea. Puesto que la administración es en una única dosis, no habría que temer la aparición de ningún efecto secundario. Siguiendo el modelo planteado por Tresguerres y colaboradores (en el que se aplicaron 4 U.I. de rhGH localmente a láminas de titanio, o bien en otras ocasiones, a implantes roscados bicorticales), en el presente trabajo se optó por la utilización de **2 U.I. de rhGH** con implantes roscados monocorticales en un modelo de coneja osteoporótica para ver si la aplicación de la mitad de dosis de hormona y el usar una fijación de titanio más pequeña era capaz de producir los mismos efectos, o conllevaba resultados distintos.

Del mismo modo que estos autores (Tresguerres *et al.*, 2002, 2003 y 2005) la aplicación local de GH liofilizada se efectúa directamente en el lecho del implante, empapándose con el coágulo sanguíneo. En la escasa literatura hallada sobre aplicación local de GH, ésta se efectúa mediante el uso de una bomba osmótica o mediante inyección local subcutánea (Andreassen y Oxlund, 2003; Hedner *et al.*, 1996; Theyse *et al.*, 2006; Hedner *et al.*, 1996); y cuando es utilizada con implantes, los autores consultados impregnan la superficie del implante, ya sea ésta de titanio o de cerámica, con la GH (Downes *et al.*, 1995; Guicheux *et al.*, 1998; Blom *et al.*, 1998;). Downes y *et al.*, utilizaron

un cemento de polimetilmetacrilato para la aplicación local, obteniendo buenos resultados, pero en su caso, no se utilizaban implantes (Downes *et al.*, 1990).

Andreassen y Oxlund inyectaron durante 14 días, 2 ó 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ de rhGH en la superficie de la diáfisis de tibias de ratas de diez meses de edad intactas y en proceso de curación de fractura (durante 21 días). Este último grupo fue dividido en dos subgrupos, un primer grupo en el que los animales fueron sacrificados a los 21 días, donde se encontró un incremento de la carga y fuerza óseas así como de las dimensiones y volumen del callo de fractura; y un segundo subgrupo en el que se sacrificó a las ratas a los 98 días, en el que se mantenía aumentada la capacidad de carga ósea, frente a control (Andreassen y Oxlund, 2003). En estos casos, no se utilizaron implantes, por lo que los resultados no son del todo comparables con los nuestros y además la dosis utilizada (2 ó 20 $\mu\text{g}/\text{día}$) es muy inferior a la empleada en nuestro experimento (2 U.I.= 0,65 mg).

Por otro lado, encontramos en la bibliografía varios autores con los que no coincidimos, que encuentran mejorías con GH en animales sanos, como Downes y colaboradores, que publicaron un trabajo en el que habían utilizado GH en un cemento de polimetilmetacrilato, colocado en fémures de conejos sanos utilizando la otra pata como control y donde observaron que, al mes, aparecía mayor porcentaje de tejido osteoide en la superficie de la zona tratada con la hormona frente a la zona control (sin GH) (Downes *et al.*, 1990). Si bien, en este caso no se utilizan fijaciones de titanio y los tiempos de estudio son diferentes; creemos que este experimento no está bien diseñado ya que la GH aplicada localmente también tiene efectos sistémicos, por lo que al ser el control el otro fémur, también estaría influido de alguna manera por la acción de la hormona.

En los trabajos llevados a cabo por Tresguerres y colaboradores (Tresguerres 1999; Tresguerres *et al.*, 2002; 2003; 2005) se desarrolló por primera vez y de forma más amplia la utilización de la hormona de crecimiento humana aplicada localmente en la colocación

de fijaciones de titanio. En el primer trabajo (Tresguerres 1999), la fase experimental constó de cinco estudios llevados a cabo en conejas jóvenes, conejas preseniles y conejas jóvenes a las que se les indujo osteoporosis experimental. En cuatro de los estudios se emplearon láminas de titanio y en el restante implantes roscados. La autora de este trabajo concluyó que los datos histológicos confirmaban que la administración local de la GH en el interior de osteotomías practicadas en las tibias de conejas jóvenes producía una estimulación de la osteogénesis a nivel perióstico y aceleraba el remodelado estimulando tanto la reabsorción como la formación en las primeras semanas, dando lugar a un hueso más irregular y a las seis semanas encontraba menos reabsorción que en el grupo control. En el modelo de osteoporosis experimental (ovariectomía más dieta hipocálcica) la administración de GH local favoreció la osteointegración transcortical, sin aumentar la reabsorción (resultados similares a los hallados en nuestro trabajo). En los animales adultos preseniles, la aplicación local de la hormona no favorecía la neoformación del callo perióstico ni la osteointegración, aunque observó que la laguna osteocitaria se agrandaba. En el estudio en mandíbula, se evidenciaron diferencias cualitativas en la respuesta del hueso membranoso, en función de un aumento del tejido mesenquimal, al compararlo con el grupo control (Tresguerres 1999).

Siguiendo la línea de estos estudios, en 2002 se publicó un trabajo en el que se constató que la aplicación local de 4 IU rhGH durante la colocación de fijaciones de titanio en tibia de conejas osteoporóticas mejoraba la reacción perióstica y transcortical y la mineralización del osteoide a las dos semanas de la cirugía, sin aumentar la reabsorción ósea (Tresguerres *et al.*, 2002).

También estos mismos efectos se hallaron en animales sanos (sin osteoporosis) al aplicar localmente 4 UI de rhGH en el lecho de colocación de implantes roscados en tibia de conejo (Tresguerres *et al.*, 2003; 2005). En cambio, nuestros resultados no arrojan

diferencias significativas, lo que podría ser debido a la menor dosis de GH utilizada y/o al potencial de crecimiento de estos animales jóvenes. En el estudio de las conejas osteoporóticas con y sin aplicación de GH, nuestros resultados sí son similares a los de esta autora.

En los trabajos ya citados de Guicheux (Guicheux *et al.*, 1998) y Downes (Downes *et al.*, 1990) donde se empleó GH local en implantes de cerámica de fosfato de calcio colocados en un cemento de polimetilmetacrilato como *carrier*, respectivamente, en fémures de conejos sanos, se encontraron incrementos significativos del crecimiento óseo y mayor porcentaje de tejido osteoide en la superficie de la zona tratada con la hormona frente a la zona control (sin GH).

En la bibliografía más reciente, se describe la aplicación de diversos *carriers* de otras sustancias distintas de GH, utilizadas en la curación de fracturas como hidrogeles de pegamento de fibrina, alginato o colágeno tipo I (Weinand *et al.*, 2007) o implantes recubiertos de poly (D, L-láctico) y de hidroxiapatita (Rocca *et al.*, 2002; Schmidmaier *et al.*, 2006) y embebidos en IGF-I, TGF- β_1 y BMP₂ (Schmidmaier *et al.*, 2006), así como terapia génica con vectores víricos para provocar la liberación local de factores de crecimiento (Ulrich-Vinther 2007). Estos autores han abierto las puertas a nuevas vías de investigación y a que en un futuro se pueda estudiar la posibilidad de utilizar alguno de estos vehículos para la GH.

También encontramos en la bibliografía una gran diversidad de artículos que tratan sobre la aplicación local de **diversas sustancias** para acelerar el proceso de curación de los defectos óseos y las fracturas, obteniéndose diversos resultados.

En humanos, la aplicación de fosfato tricálcico con rhPDGF en defectos periodontales eleva los niveles de VEGF en el fluido crevicular y de ICTP, sugiriendo un

aumento del *turn over* en los primeros estadios del proceso de reparación ($p < 0,02$) (Cooke *et al.*, 2006).

La BMP-7 o proteína osteogénica 1 (OP-1) en bomba de liberación local en tibias de conejo en contacto con tejido óseo y en presencia de factores adversos (partículas de polietileno y AINEs) mejora la formación local de hueso (Ma *et al.*, 2006), y vehiculizada por implantes de titanio recubiertos de apatita, favorece la osteointegración de implantes en defectos óseos en fémur de conejo (Zhang *et al.*, 2004).

Se sabe que la combinación de rhBMP-2 y una esponja de colágeno absorbente (ACS) induce la formación ósea en experimentos preclínicos y clínicos (Milovancev *et al.*, 2007; Glassman *et al.*, 2007, 2005; Singh *et al.*, 2006). En 2002, la rhBMP-2/ACS a una concentración de 1,5 mg/cc fue aprobada por la FDA (Infuse®, *Bone Graft, Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN*). En marzo de 2007, Infuse® fue aprobada por la FDA como alternativa a los injertos de hueso autógeno utilizados en las elevaciones sinusales y para aumento de cresta alveolar en defectos de extracciones (McKay *et al.*, 2007). Recientemente, un estudio ha revelado que la aplicación de un dominio de unión al colágeno a la rh-BMP2 mejora cuantitativa y cualitativamente la formación ósea en un modelo de defecto óseo en conejo (Chen *et al.*, 2007).

Asimismo, se ha descrito que los geles ricos en plaquetas, fuente de gran cantidad de factores de crecimiento, mejoran el callo de fractura en ratas diabéticas (Gandhi *et al.*, 2006).

El cemento de fosfato cálcico (Oda *et al.*, 2006), o el poliuretano con aceite de castor (Pereira-Júnior *et al.*, 2007) aplicados localmente para rellenar defectos óseos, disminuyen la formación de tejido fibroso y son biocompatibles, pero no pueden sustituir al injerto de hueso esponjoso.

El uso de bifosfonatos, sustancias que se han utilizado habitualmente para el tratamiento de la osteoporosis, es actualmente motivo de controversia, tras la publicación de varios casos de osteonecrosis avascular en pacientes tratados durante largos periodos de tiempo (Wang *et al.*, 2007) y se ha demostrado que el pamidronato, aplicado localmente en defectos óseos de calota de conejo, inhibe la curación ósea (Choi *et al.*, 2007), por tanto, la utilización de estas sustancias requiere un fino control de las dosis y del tiempo de aplicación, para conseguir óptimos resultados (Amanat *et al.*, 2007; Bagan *et al.*, 2005, 2006).

En cuanto al **tipo de implante** utilizado, hoy en día parece ampliamente aceptado por la comunidad científica la utilización de fijaciones de titanio roscadas, en vez de impactadas (Lugero *et al.*, 2000) para conseguir mejor osteointegración así como implantes de superficie tratada (Franchi *et al.*, 2007; Giavaresi *et al.*, 2004), como es el caso del utilizado en nuestro trabajo, que aumentan considerablemente la superficie de contacto con el hueso.

La **técnica de colocación** de los implantes empleada intenta reproducir lo más fielmente posible las condiciones que se dan en los maxilares humanos, evitando el contacto con el endostio del lado opuesto, ya que en otros trabajos donde el anclaje de las fijaciones es bicortical (Tresguerres *et al.*, 2005, 2003 y 2002; Tresguerres, 1999; Mori *et al.*, 1997), parece ser que la actividad ósea podría acelerarse en presencia de un estímulo como la cirugía o un traumatismo (Slotte *et al.*, 2003; Frost, 1986), por lo que hemos decidido colocar los implantes monocorticales (Rocca *et al.*, 2002), para evitar esta situación que podría alterar los resultados. Tampoco hemos considerado la opción de los implantes intramedulares (Clemente *et al.*, 2000), porque no reproducen fielmente la situación clínica de los maxilares (anclaje cortical y medular).

Con respecto a la **metodología** empleada para el estudio de la interfase hueso-implante, los nuevos procedimientos que permiten cortar a la vez metal y hueso sin decalcificar este último, como es la inclusión en metacrilato (Donath y Breuner, 1982) y el sistema de polimerización, corte y pulido de Exakt®, presentan evidentes ventajas frente a los métodos tradicionales de decalcificación e inclusión en parafina, en los que se desnaturalizaba el hueso, o los métodos de fractura (Clockie y Warshawsky, 1995) o de remoción electroquímica del implante (Björsten *et al*, 1990), inexactos y desmineralizantes, respectivamente. A pesar de todo, se deben tener en cuenta las dificultades técnicas que este método conlleva para no alterar la interfase hueso-implante y que a veces provocan artefactos, inherentes a la realización de la técnica. Las tinciones empleadas son las habituales en microscopía óptica.

El análisis de los datos derivados del **ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO** muestra que ni la OVX, ni la GH tienen efecto significativo en el porcentaje de osteointegración en la tibia de forma individual (tampoco el hecho de que se trate de la tibia derecha o izquierda), pero sí la tiene la **interacción de los factores OVX y GH** ($p < 0,01$) (Fig. 40), esto es, se tienen que dar los dos factores para que aparezcan resultados significativos, de tal modo que encontramos que:

- **no hay diferencias significativas en el *BIC* entre los grupos OVX e INTACTO**, pero
- **cuando no se suministra la hormona del crecimiento, el *BIC* disminuye en el grupo OVX**, frente al INTACTO (donde hay mayor *BIC*), de forma estadísticamente significativa; confirmando así que en la osteoporosis experimental hay una disminución del porcentaje de osteointegración alrededor de los implantes, cuando no se aplica GH.

- **y cuando se aplica GH, se produce una disminución del *BIC* en el grupo INTACTO y un aumento en el grupo OVX.** Lo que indica dos situaciones, por un lado que la hormona del crecimiento no tiene un efecto beneficioso sobre el *BIC* en situaciones de *turn over* normal (INTACTO) y que en cambio sí es beneficiosa en situaciones de *turn over* elevado, como es el caso de la osteoporosis experimental (OVX).

La OVX no produce diferencias SS en el *BIC* por sí sola

Cuando NO se aplica GH, el *BIC* disminuye en el grupo OVX

Es posible deducir que aunque la presencia de osteoporosis puede alterar los procesos reparativos alrededor de los implantes, la osteointegración se consigue incluso en presencia de esta patología.

Muchos autores encuentran alteraciones en el *BIC*, en los modelos osteoporóticos. Así, Duarte *et al.* (2005) al estudiar en ratas la influencia de la edad y de la osteoporosis experimental (OVX) en el hueso periimplantario de fijaciones roscadas colocadas en tibia, encontraron que el *BIC* se alteraba significativamente ($p < 0,05$) en las regiones de hueso trabecular en el grupo OVX, no encontrando diferencias entre los dos grupos en la zona de hueso cortical, concluyendo que la edad afectaba principalmente al hueso pre-existente mientras que la ovariectomía alteraba significativamente tanto el hueso pre-existente como el neo-formado, por tanto, la deficiencia estrogénica podría afectar a la curación ósea y a la densidad periimplantarias en ratas, especialmente en la zona de hueso esponjoso (Duarte *et al.*, 2003). También en tibias de ratas sometidas a ovariectomía y neurotomía se constató menor *BIC* en cilindros de Ti-6Al-4V que en las tibias control (Hayashi *et al.*, 1994). Utilizando implantes roscados de titanio Yamazaki *et al.* obtuvieron resultados similares (Yamazaki *et al.*, 1999). Fini y colaboradores (2000) implantaron clavos hechos de varios

materiales, entre otros de una aleación de titanio (Ti-6Al-4V: Ti) en la parte distal de fémures de ratas sanas y ovariectomizadas. El análisis histomorfométrico mostró que la tasa de osteointegración en el caso de la aleación de Ti era significativamente menor ($p < 0,001$) en el grupo OVX que en el control.

Por el contrario, estos mismos autores, en otros trabajos, no hallan resultados significativos, coincidiendo con los nuestros, aunque sí disminución en el grupo OVX, en el *BIC* con clavos de titanio insertados en ratas (Fini *et al.*, 2001; 1997). Otro trabajo afirma que a los treinta días de haber colocado el implante no se encontraron diferencias significativas en dos modelos distintos de osteoporosis en rata (con *turn over* alto y bajo) (Okamura *et al.*, 2004), achacando las variaciones precisamente a la diversidad de osteogénesis alrededor de los implantes. Parece que puede existir un posible efecto bifásico relacionado con la deficiencia hormonal estrogénica, que afectaría temporalmente al proceso de integración de los tejidos periimplantarios en los primeros estadios (a las 2 semanas) y que posteriormente, una vez establecido el proceso (a las 4 semanas), se podría encontrar integración funcional incluso en las ratas ovariectomizadas (Ozawa *et al.*, 2002). Por tanto, en función del momento del estudio, se podrían encontrar datos contradictorios. Por otro lado, la disparidad de resultados hallados en la literatura puede estar producida en parte por la dificultad de obtener medidas estandarizadas alrededor de los implantes (Ozawa *et al.*, 2002).

En el modelo osteoporótico de oveja, aunque se han llevado a cabo muy pocos trabajos con implantes de titanio, se obtienen resultados similares respecto a la disminución del *BIC* (Rocca *et al.*, 2001; 2002). Para evaluar la osteointegración de implantes de titanio roscados cubiertos o no de HA, Rocca y colaboradores utilizaron un modelo de oveja osteoporótica. A las 12 semanas de colocadas las fijaciones, se realizaron pruebas de extracción de torque e histomorfométricas (*BIC*) en los fémures y las tibias de

las ovejas. Encontraron diferencias S.S. en todos los parámetros con disminución del *BIC* en el grupo OVX. Los autores encontraron mejorías significativas al utilizar los implantes recubiertos de HA. Estos datos arrojan nuevas vías de investigación, ya que en un futuro, se podría observar el comportamiento de la osteointegración de estos implantes junto con la hormona de crecimiento.

Cuando se aplica la GH, se produce una disminución del *BIC* en el grupo INTACTO y aumento en el grupo OVX.

Volviendo al gráfico de la figura 40 (Fig. 40), se observa que la aplicación de las 2 U.I. de rhGH en el grupo OVX-GH, mejora sustancialmente el porcentaje de osteointegración, frente al INTACTO-GH ($p = 0,033$). Nuestros resultados confirman la hipótesis del **efecto beneficioso de la hormona del crecimiento en la interfase hueso-implante en los sujetos con osteoporosis experimental**. Este resultado se podría explicar por la mayor acción de la GH sobre aquellos huesos con un *turn over* elevado, frente a un hueso sano, no osteoporótico, en el que el *turn over* sería normal.

En la literatura, son muy escasos los artículos que abordan el uso **local** de la hormona del crecimiento.

Uno de los pocos trabajos encontrados en la bibliografía que utiliza un modelo animal con implantes más GH es el de Blom y colaboradores, que estudiaron el crecimiento óseo y el contacto con el hueso de implantes con distintos tratamientos de superficie (hidroxiapatita, fluorapatita, hidroxiapatita más calor e implantes sin tratar) impregnados la mitad de ellos con GH y colocados en la cortical femoral de cabras hembra, despreciando la zona en relación con el periostio. A las seis semanas de colocadas las fijaciones, se sacrificó a los animales y se procedió a la preparación y al estudio microscópico y de análisis digital de la imagen de las muestras. Los resultados mostraron que en los implantes con GH, el contacto y el crecimiento óseos disminuían, de forma

significativa en el caso de los implantes sin tratamiento de superficie. Los autores explican los resultados aparentemente contradictorios del comportamiento de la GH argumentando que posiblemente la concentración de GH fuese tan grande que hubiera podido provocar un efecto inhibitor sobre los osteoblastos (Blom *et al.*, 1998). Los datos de este trabajo se asemejan más a los obtenidos en nuestro estudio, ya que en uno de los grupos utilizan un implante con superficie sin tratar, encontrando también una disminución significativa del *BIC*, a pesar de que los animales fueron sacrificados a las 6 semanas.

Ya más recientemente, encontramos los trabajos llevados a cabo por Tresguerres y colaboradores (Tresguerres 1999; Tresguerres *et al.*, 2002; 2003; 2005) en los que tras la administración local de la GH en el interior de osteotomías practicadas en las tibias de conejas jóvenes encontraron que, en la 2ª semana, el índice de afinidad (porcentaje de osteointegración) era menor que en el grupo control. En el modelo de osteoporosis experimental (ovariectomía más dieta hipocálcica) la administración de GH local favoreció la osteointegración transcortical, sin aumentar la reabsorción (resultados similares a los hallados en nuestro trabajo). En los animales adultos preseniles, la aplicación local de la hormona no favorecía la osteointegración (Tresguerres 1999).

Siguiendo la línea de estos estudios, en 2002 se publicó un trabajo en el que se constató que la aplicación local de 4 IU rhGH, durante la colocación de fijaciones de titanio en tibia de conejas osteoporóticas, mejoraba la reacción perióstica y transcortical y la mineralización del osteoide a las dos semanas de aplicada, sin aumentar la reabsorción ósea (Tresguerres *et al.*, 2002), aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, quizá por el escaso tamaño de la muestra.

También estos mismos efectos se hallaron en animales sanos (sin osteoporosis) al aplicar localmente 4 UI de rhGH en el lecho de colocación de implantes roscados en tibia de conejo, con un aumento significativo ($P < .05$) del porcentaje de osteointegración a las 2

y 6 semanas (Tresguerres *et al.*, 2003; 2005), lo que no concuerda con nuestros resultados, ya que en el presente trabajo, a las 2 semanas hemos encontrado que en el grupo de conejas intactas, la aplicación de la hormona no mejora el porcentaje de osteointegración de los implantes. Puesto que nuestro protocolo de trabajo es similar al de este estudio, una posible explicación de estas discrepancias es el hecho de que los implantes de la investigación llevada a cabo por estos autores sean bicorticales, por lo que se produce la estimulación del periostio de la cortical opuesta, con el consiguiente incremento de formación de callo óseo, en contra de lo que sucede en el nuestro, que por ser monocorticales, sólo obtienen estimulación perióstica de la zona más cercana al implante. Por otro lado, es posible que en nuestro trabajo la cantidad utilizada de GH, 2 UI frente a las 4 UI usadas por ellos, no sea suficiente para conseguir la estimulación necesaria de nuevas trabéculas óseas.

No encontramos correspondencia con los resultados del trabajo publicado en 1998 por Guicheux y colaboradores (1998) que emplearon implantes de cerámica de fosfato de calcio de macroporo con cargas de hGH de 1, 10 y 100 µg., colocados en fémures de conejos sanos, con el fin de estudiar mediante microscopio electrónico y análisis de la imagen los efectos de la hormona del crecimiento sobre el crecimiento óseo y la reabsorción del material de cerámica empleado. Encontraron que la hGH producía un incremento significativo del crecimiento óseo y mejoraba la sustitución del biomaterial frente a los implantes control. Es posible que los implantes de titanio recubiertos de hidroxiapatita y cargados con GH produzcan más *BIC* que los de titanio aislado, lo que abre una posible nueva línea de investigación en este campo.

La mayoría de los trabajos consultados en la bibliografía sobre la aplicación de la hormona del crecimiento en estudios experimentales animales con osteopenia u osteoporosis utilizan ésta de forma **sistémica**, pero lamentablemente, ninguno estudia la inserción de estructuras de titanio.

Utilizando un modelo de rata ovariectomizada, Mosekilde y colaboradores demostraron que tras 3 meses de tratamiento con distintas cantidades de GH, la hormona fue capaz de revertir la pérdida ósea inducida por la osteoporosis en las vértebras, de forma dosis dependiente. En la diáfisis femoral, la GH incluso incrementó los valores de carga de forma significativa al compararlos con el grupo control o con el *sham*. Sin embargo, en la metáfisis distal del fémur, donde el hueso es más esponjoso, sólo se vieron efectos parciales del tratamiento. La dosis de 50 µg / kg peso/ día no tuvo influencia en ninguna de las medidas. Por tanto, los efectos del tratamiento con GH en la ovariectomía dependen del lugar donde se mida y de la cantidad de hueso perdido con anterioridad (Mosekilde *et al.*, 98).

Stenport y colaboradores (2001) investigaron si la aplicación continua y sistémica de hormona del crecimiento humana (hGH) a conejos sanos a los que se les había colocado un implante en la tibia, mejoraba la osteointegración de los mismos. Las conclusiones a las que llegaron es que a las 8 semanas de su colocación y de la aplicación de la hormona, no existían diferencias estadísticamente significativas en las medidas histomorfométricas (porcentaje de contacto hueso-implante y área ósea en todas las espiras y en las tres primeras espiras). Encontraron que la hormona presenta un efecto beneficioso inicial, pero que sin embargo, debido a la rápida formación de anticuerpos, no se podía saber si este efecto permanecería a lo largo del tiempo.

En nuestro trabajo no se ha estudiado la posible formación de anticuerpos, si bien no hemos observado reacciones inflamatorias ni aparición brusca de células multinucleadas, de todas formas, nuestros animales fueron sacrificados a las 2 semanas, lo que quizá constituya un periodo demasiado temprano para observar tales hechos.

El **ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO** muestra que la mayoría de los resultados significativos aparecen en la región definida como **IMPLANTE**, que es la más próxima a la herida quirúrgica y que incluye la fijación de titanio, pero puesto que el valor de la fijación debería ser igual en todos los casos, es posible que el método de medición DEXA utilizado no sea el más adecuado, por inexacto, para valorar implantes roscados tan pequeños en animales como el conejo, ya que la unidad más pequeña que se puede utilizar en el aparato Norland, puede que resulte demasiado grande para este tipo de fijaciones, por lo que se decidió prescindir de la región **IMPLANTE** y evaluar los resultados obtenidos en la región **ALREDEDOR** (que resta el contenido del implante de titanio).

En nuestro trabajo, al realizar la medición con **DEXA** de la **DMO** en las zonas **ALREDEDOR e IMPLANTE**, encontramos que el factor **OVX** por sí solo produce una **disminución** significativa ($p < 0,01$ y $p < 0,005$ respectivamente) de la densidad mineral ósea en las conejas osteoporóticas frente a las intactas, y una fuerte tendencia en la región **SUMA**. Así mismo, se aprecia una disminución significativa de la DMO en la **interacción de los tres factores (en este caso) (GH, OVX, y TIBIA)**, ($p = 0,001$ y $p = 0,003$).

Hay varios trabajos en la literatura realizados sobre conejas osteoporóticas que evalúan la densidad mineral ósea en relación con implantes de titanio (Fujimoto *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1997; Lugero *et al.*, 2000), pero que no utilizan hormona del crecimiento.

En el trabajo de Mori *et al* (1997) donde se utilizaron tres grupos de conejos (OVX, OVX + dieta hipocálcica y control), se colocaron implantes de titanio en la tibia de las conejas un mes tras la ovariectomía; se estudió en profundidad la interfase hueso-implante y se midió la DMO al mes, a los tres meses y a los 6 meses tras la ovariectomía. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos OVX y control, pero sí entre el

grupo OVX + dieta hipocálcica y control. Estos resultados son similares a los hallados por nosotros al desarrollar el modelo de osteoporosis experimental.

Fujimoto y colaboradores (1998) utilizaron un modelo de coneja osteoporótica secundaria a la administración de corticoides, donde colocaron implantes de titanio en mandíbula y tibia. Tres meses después, se sacrificó a los animales y se midió la densidad mineral ósea en el fémur y el torque necesario para extraer los implantes previamente colocados, encontrando una disminución significativa en el torque en la tibia de las conejas tratadas con prednisolona, que además se correlacionaba con una menor DMO del fémur. En la mandíbula no encontraron diferencias entre los dos grupos, por lo que concluyeron que la administración de corticoides debía tener menos efecto en la osteointegración de los implantes en la mandíbula que en el resto del esqueleto.

Lugero y colaboradores midieron el hueso neoformado y la DMO alrededor de dos tipos de fijaciones de titanio, roscadas y cilíndricas, colocadas en conejas osteoporóticas, y vieron que el volumen trabecular y la aposición ósea eran significativamente mayores en el grupo control que en los animales osteoporóticos. También constataron que alrededor de las fijaciones roscadas se formaba más hueso que alrededor de las cilíndricas (Lugero *et al.*, 2000).

También en los datos aportados por el estudio de Roca *et al* (2002) en ovejas ovariectomizadas en las que se estudiaron dos tipos de implantes de Ti6Al4V, unos cubiertos de HA y otros no, se reflejaban diferencias estadísticamente significativas en la DMO y en el CMO entre el grupo OVX y el control.

Clemente y colaboradores estudiaron la densidad ósea alrededor de implantes recubiertos de HA colocados en el canal medular de fémures de rata. Encontraron mayor densidad en el grupo control que en el OVX, siendo significativa en la zona de hueso

inmediatamente proximal al implante, pero no en la densidad total del fémur. (Clemente *et al.*, 2000).

Estos resultados se asemejan a los encontrados en nuestro trabajo, donde tampoco encontramos diferencias significativas en la región TOTAL de la tibia.

Con la aplicación de GH

En un trabajo realizado en ratas ovariectomizadas, comparando la aplicación de rhGH, rhIGF-I, estradiol o suero salino, los autores encontraron que el grupo tratado con una inyección subcutánea 75 µg/ día de rhGH durante 8 semanas la DMO de la metáfisis distal del fémur se mantuvo en los valores previos al tratamiento (medido con DEXA). El volumen de las trabéculas óseas en la metáfisis tibial fue mayor que en el grupo tratado con suero salino y más evidente en la esponjosa primaria. La DMO en la diáfisis femoral fue 12-14% mayor ($p < 0.001$) tras 8 semanas de tratamiento con GH comparado con los grupos control. Es decir, que la GH en ratas OVX previno la pérdida de masa ósea y de fuerza en el hueso trabecular, aumentando la masa de hueso cortical por encima de los valores pretratamiento (Verhaeghe *et al.*, 1996), a pesar de que la dosis de GH utilizada era baja.

Tresguerres y colaboradores, en el modelo de osteoporosis experimental (ovariectomía más dieta hipocálcica) observaron menor densidad ósea *in vitro* en el grupo ovariectomizado (Tresguerres 1999; 2002), pero los resultados no fueron estadísticamente significativos.

En nuestro estudio, al realizar la medición de la **DMO** mediante DEXA en la coneja Nueva Zelanda se observa que el **factor GH**, por sí solo, **no produce diferencias estadísticamente significativas**, y la densidad es algo menor en el grupo tratado con GH. Esto parece explicarse por el propio mecanismo de actuación de la hormona que favorece

primero la reabsorción (Nishiyama *et al.*, 1996), lo que se traduciría en una disminución de la densidad en los primeros estadios de su aplicación, por lo que posiblemente sería necesario más tiempo para observar un aumento de la DMO. Como ya se ha comentado anteriormente, parece ser que la hormona del crecimiento, puesto que activa el remodelado, produciría primero una disminución de la densidad, en las primeras etapas del tratamiento (aunque haya aumento del tejido osteoide), como es nuestro caso (15 días), necesitándose un tratamiento a más largo plazo para ver cambios positivos en la DMO, cuando se deposita el calcio. Sí hay una fuerte tendencia al aumento del área cuando se aplica GH, lo que también explica la disminución de la DMO y el propio mecanismo de acción de la hormona. En cualquier caso, puede que el tamaño de la muestra sea pequeño y que sean necesarios más trabajos para poder dilucidar este punto, o que, como ya se ha comentado anteriormente, el método de medición DEXA no sea adecuado para este tipo de implante.

En cuanto a la DMO, Tresgueres y colaboradores tampoco encontraron resultados significativos de la hormona en coneja Nueva Zelanda, lo que sí coincide con nuestros resultados (Tresgueres *et al.*, 2005), aunque ellos sí apreciaron una tendencia al aumento de DMO en el grupo GH, posiblemente achacable de nuevo a la estimulación bicortical de las fijaciones (Tresgueres 1999; Tresgueres *et al.*, 2002; 2003; 2005).

En los animales sanos (sin osteoporosis) al aplicar localmente 4 UI de rhGH en el lecho de colocación de implantes roscados en tibia de conejo, a las 2 y 6 semanas (Tresgueres *et al.*, 2003; 2005) observaron una tendencia al aumento del área ósea y una disminución de la densidad mineral ósea, al igual que ocurre en este trabajo.

Cuando la aplicación de la GH es **sistémica** en animales de experimentación, los resultados del DEXA encontrados son similares (no significativos), si bien destacamos de

nuevo que no hemos hallado bibliografía en la que se aplique la GH sistémica y se utilice a la vez algún tipo de estructura de titanio intraósea por lo que los autores no investigan ni el porcentaje de osteointegración ni la DMO alrededor del implante. En el trabajo de Mann *et al.* (1992) se estudió el efecto sistémico de la rhGH en un grupo de monas que habían sido sometidas primero, a una dieta rica en calcio durante 5 meses, y después sustituida por una dieta hipocálcica a lo largo del tratamiento, y durante 5 meses tras la aplicación del mismo. Al pasar a esta dieta pobre en calcio, los animales se asignaron aleatoriamente a tres grupos: en el primero se utilizó un placebo; en el segundo se les administró 25µg diarios de un agonista de GnRH (GnRH-Ag), por lo que se convirtieron en macacas hipogonadales, y en el tercer grupo, se suministró el GnRH-Ag más una inyección i.m. de 100 µg /peso de GH tres veces por semana. El tratamiento duró 10 meses. Se observó una disminución de la DMO en la columna lumbar a los 6 meses del tratamiento y durante tres meses después de dejarlo, en el grupo GnRH-Ag, sin embargo, la DMO no varió de forma significativa en el grupo que recibió el suplemento de GH (Mann *et al.*, 1992).

Se consigue un aumento de la longitud, el área y el volumen, es decir, del tamaño óseo, en ratas en crecimiento tras aplicarles hGH durante 4 semanas, si bien la DMO disminuye, medida con DEXA y con pQCT (Rosen *et al.*, 1995), al igual que ocurre en nuestro trabajo.

En el estudio de Wright y colaboradores, no se encontraron diferencias en cuanto a volumen óseo en las ratas enanas dw/dw tratadas con GH en comparación con los animales normales, mientras que sí se encontró una disminución en la densidad mineral ósea y un aumento en la fosfatasa alcalina sérica (Wright *et al.*, 1995 b). En otro trabajo también aparece un incremento de la formación de hueso perióstico y de la deposición de colágeno y una ligera disminución del DMO (Martínez *et al.*, 1996), coincidiendo con nuestros datos.

En **humanos**, la aplicación de GH activa las unidades remodeladoras de hueso, aumentando la diferenciación de los osteoclastos y los osteoblastos, que una vez activadas, recorren un ciclo completo de “vida” (Wüster *et al.*, 1998). Cada unidad metabólica es responsable de la reabsorción y subsiguiente nueva síntesis de una cantidad específica de hueso. Cualquier aumento en el número de estas unidades activas simultáneamente en el esqueleto produce una disminución de la DMO y del CMO, debido al agrandamiento del llamado “espacio de remodelado óseo” e independiente del balance neto entre reabsorción y formación al final del ciclo de remodelado en cada unidad metabólica. Se sabe que el efecto del tratamiento con GH en adultos ejerce un efecto peculiar sobre el metabolismo óseo, no sólo acelera de forma marcada el *turn over* óseo a través del incremento de la activación de nuevas unidades metabólicas óseas, sino que también estimula la aposición ósea perióstica, que conlleva el agrandamiento de la anchura ósea. La combinación de estos dos efectos distintos pueden, de forma simultánea, aumentar tanto el contenido mineral óseo como el área de proyección del hueso, lo que se traduce en cambios en la DMO que son menos marcados que los cambios totales del contenido mineral óseo. Por la misma razón, cuando decrece el *turn over* óseo (p.e. tras la administración de bifosfonatos), disminuye el espacio de remodelado, lo que lleva a un incremento del CMO y de la DMO (Ortolani, 2000).

Corroborando estos hechos, encontramos el trabajo de Cuttica y colaboradores, donde tras 6 meses de administración subcutánea de 2 UI de rhGH a sujetos sanos mayores no encontraron mejoría en la densidad mineral ósea, aunque sí aumento de peso, disminución de la grasa corporal, mejoría de la fuerza muscular y aumento de los marcadores de reabsorción y formación ósea, así como aumento de los niveles sanguíneos de IGF-I (Cuttica *et al.*, 1997).

En diversos estudios se ha visto que tanto la reabsorción como la formación óseas estaban aumentadas en sujetos jóvenes sanos (Brixen *et al.*, 1990, Marcus *et al.*, 1990), concluyendo que el tratamiento con GH activa las unidades remodeladoras de hueso.

En los trabajos revisados, tampoco hemos encontrado ningún análisis de la utilización conjunta de GH en sujetos osteoporóticos con algún tipo de superficie recubierta de titanio.

Ya en 1998, Wüster y colaboradores (1998) realizaron un trabajo de revisión sobre la aplicación de la GH en pacientes: sanos, con osteoporosis, en ancianos y en casos de deficiencia de GH -GHD- (en los que la masa ósea está disminuída). Vieron que tras administrar GH a los pacientes con GHD se producía un aumento del *turn over* y que la densidad mineral disminuía inicialmente, durante el primer año de tratamiento, debido al aumento del espacio de remodelado. En los pacientes con osteoporosis, el sistema GH/IGF-I estaba mal regulado, ya que la secrección de GH se hallaba disminuída, y se encontraron valores bajos de IGF-I y II e IGFBP-3 en mujeres con osteoporosis postmenopáusica en comparación con mujeres normales.

En los casos de panhipopituitarismo, tras el tratamiento con la hormona durante 2 años, aunque aumentaron los marcadores bioquímicos del *turn over* óseo, no se evidenciaron cambios correlativos en la DMO (Balducci *et al.*, 1995).

Landin-Wilhelmsen *et al* (2003) sí encontraron diferencias significativas en la DMO o en el CMO al finalizar el estudio con 80 mujeres osteoporóticas que habían recibido previamente THS, y a las que se les suministró durante 18 meses 1 u/día de GH, o 2,5 U/día, o placebo (todas recibieron calcio y vitamina D), aunque ni al principio ni a los 5 años de terminar el tratamiento, existían tales diferencias. Concluyeron que la GH producía un efecto tardío, prolongado y dosis dependiente en la osteoporosis

postmenopáusica y que podría ser usada como agente anabólico en el tratamiento de esta enfermedad.

También en niños prepúberes con GHD, tras doce meses de terapia con GH, se vio que la densidad cortical disminuía de forma significativa con respecto al comienzo del estudio, mientras que el área y el grosor corticales y medulares no variaron. Se explicaron estos hallazgos por el aumento de metabolismo óseo debido al tratamiento con la hormona, que hace que el hueso crezca muy rápidamente durante el primer mes, lo que lleva a una disminución de la densidad ósea por la formación de nuevo hueso sin mineralizar (Schweizer *et al.*, 2003).

Tampoco en el trabajo de Hansen y colaboradores (1996) se encontró mejoría significativa de la DMO tras 12 meses de terapia en adultos con GHD, es más, disminuyó significativamente la DMO total y la del radio.

En resumen, se observa que sólo en los estudios a largo plazo de 18 a 24 meses se evidencia un aumento neto de la DMO en humanos con GHD (Thoren *et al.*, 1993; Baum *et al.*, 1996; Nilsson, 2000).

Un hallazgo universal es que los niveles urinarios de los marcadores bioquímicos de remodelado aumentan al administrar GH de forma dosis dependiente. El CMO aumenta mucho más que la DMO (Nilsson, 2000).

Generalmente, los marcadores bioquímicos de la remodelación ósea aumentan, sin embargo, hoy en día no se pueden discutir los efectos sobre el metabolismo óseo de la administración de GH en humanos sin considerar la administración simultánea de esteroides sexuales y el nivel de secreción endógena de GH. Esta es la llave que explica las diferencias que aparecen en los efectos de la administración de GH en hombres mayores sanos con bajos niveles de IGF-I (Rudman *et al.*, 1990; Cuttica *et al.*, 1997) y en mujeres mayores sanas con y sin estrógenos pero con niveles de IGF-I normales (Holloway *et al.*,

1994; Ghiron *et al.*, 1995). Además, existen diferencias en función del género en cuanto a la respuesta a la terapia con GH se refiere, ya que las mujeres en general, tienen mayores niveles de secreción de GH, que decrecen con la edad (Eden Engstrom *et al.*, 2002), pero los valores de los marcadores séricos de IGF-I y de remodelado óseo son similares a los de los varones. Una posible explicación a este hecho es el patrón de esteroides, que es distinto en ambos sexos; se ha visto que las mujeres que toman estrógenos orales, necesitan mayor dosis de GH para alcanzar las mismas concentraciones en sangre de IGF-I (Cook *et al.*, 1999; Eden Engstrom *et al.*, 2000).

En general, la aplicación de la GH produce un incremento de la aposición perióstica (Andreassen y Oxlund, 2000). La combinación del incremento del depósito mineral y del crecimiento perióstico se traduciría en una mejoría importante de la fuerza ósea tras la terapia con la hormona, especialmente si se combina con antiresortivos. Este efecto también explicaría por qué existe una gran discrepancia entre los datos de la DMO medida con DEXA de los pacientes tratados con GH, y la posibilidad de que la rhGH pudiera tener un efecto más marcado en la reducción de fracturas del que puede ser explicado mediante la densitometría (Rosen y Wüster, 2003).

7. CONCLUSIONES

Por todo ello, llegamos a las siguientes CONCLUSIONES:

1. La osteoporosis experimental se induce en la coneja Nueva Zelanda de 6 meses mediante la combinación de ovariectomía y dieta hipocálcica de manera reproducible a las 7 semanas de aplicación del tratamiento; se constata una disminución de la DMO estadísticamente significativa en la calota y columna cervical.
2. Se demuestra la osteointegración de los implantes de titanio roscados en la tibia en el modelo de osteoporosis experimental mediante técnicas histológicas y morfométricas.
3. En el grupo de animales osteoporóticos, existe una disminución significativa de la DMO ($p = 0,01$) y el *BIC* es más pobre que en el grupo de animales no osteoporóticos.
4. La aplicación de rhGH en el grupo de animales no osteoporóticos no mejora el *BIC* ni la DMO alrededor del implante.
5. En el modelo de osteoporosis experimental, la aplicación de 2 UI de rhGH en el lecho quirúrgico de colocación de un implante mejora significativamente el *BI+C* ($p < 0,01$) y la DMO ($p < 0,001$) alrededor de la fijación a los 15 días de su implantación.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aberg ND, Bryve KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:53-80. Review.
2. Agnosedì D, Crepaldi G, Isaia G, Mazzuoli G, Ortolani S, Passeri M, et al. A double blind, placebo-controlled trial of ipriflavone for prevention of postmenopausal spinal bone loss. *Calcif Tissue Int*. 1997;61:142-7.
3. Akahoshi S, Sakai A, Arita S, Ikeda S, Morishita Y, Tsutsumi H, Ito M, Shiraishi A, Nakamura T. Modulation of bone turnover by alfacalcidol and/or alendronate does not prevent glucocorticoid-induced osteoporosis in growing minipigs. *J Bone Miner Metab*. 2005;23:341-50.
4. Akiyama T, Miyazaki T, Bouillet P, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. In vitro and in vivo assays for osteoclast apoptosis. *Biol Proced Online*. 2005;7:48-59.
5. Albertazzi P, Di Micro R, Zanardi E. Tibolone: a review. *Maturitas*. 1998;30:295-305.
6. Alexandersen P, Toussaint A, Christiansen C, Devogelaer JP, Roux C, Fechtenbaum J, et al. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;285:1482-8.
7. Altman A, Hochberg Z, Silbermann M. Interactions between growth hormone and dexamethasone in skeletal growth and bone structure of the young mouse. *Calcif Tissue Int*. 1992;51:298-304.
8. Items 1 - 20 of 22Page of 2Next
9. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res*. 2007;22:867-76.
10. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, Dubese RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T -cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390:175-9.
11. Anderson JJ, Chen X, Boass A, Symons M, Kohlmeier M, Renner JB, Garner SC. Soy isoflavones: no effects on bone mineral content and bone mineral density in healthy, menstruating young adult women after one year. *J Am Coll Nutr*. 2002;21:388-93.
12. Andreassen TT, Jorgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1057-67.
13. Andreassen TT, Oxlund H. Additive anabolic effects of growth hormone and parathyroid hormone on vertebral body cortical and cancellous bone in old ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1996;11 Suppl 1:S457-60.
14. Andreassen TT, Oxlund H. Local anabolic effects of growth hormone on intact bone and healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int*. 2003;73:258-64.
15. Andreassen TT, Oxlund H. The influence of combined parathyroid hormone and growth hormone treatment on cortical bone in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2000;15:2266-75.
16. Ang ES, Zhang P, Steer JH, Tan JW, Yip K, Zheng MH, Joyce DA, Xu J. Calcium/calmodulin-dependent kinase activity is required for efficient induction of osteoclast differentiation and bone resorption by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL). *J Cell Physiol*. 2007;212:787-95.
17. Arjmandi BH, Birnbaum RS, Juma S, Barengolts E, Kukreja SC. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanisms. *Calcif Tissue Int*. 2000;66:61-5.
18. Backeljauw PF, Underwood LE. Prolonged treatment with recombinant insulin-like growth factor-I in children with growth hormone insensitivity syndrome--a clinical research center study. GHIS Collaborative Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:3312-7.
19. Backeljauw PF, Underwood LE; GHIS Collaborative Group. Growth hormone insensitivity syndrome. Therapy for 6.5-7.5 years with recombinant insulin-like growth factor I in children with growth hormone insensitivity syndrome: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1504-10.
20. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, Diaz JM, Scully C. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol*. 2006;42:327-9. Epub 2005 Nov 4. Review.
21. Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, Poveda R, Milian MA, Sanchis JM, Silvestre FJ, Scully C. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:120-3. Review.
22. Bagi CM, DeLeon E, Brommage R, Adams S, Rosen D, Sommer A. Systemic administration of rhIGF-I or rhIGF-I/IGFBP-3 increases cortical bone and lean body mass in ovariectomized rats. *Bone*. 1995;16(4 Suppl):263S-269S.
23. Bail HJ, Kolbeck S, Krummrey G, Schmidmaier G, Haas NP, Raschke MJ. Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing. *Horm Res*. 2002;58 Suppl 3:39-42.
24. Bak B, Andreassen TT. The effect of growth hormone on fracture healing in old rats. *Bone*. 1991;12:151-4.
25. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone*. 1990;11:233-9.
26. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop*. 1991;264:295-301.
27. Baker AR, Hollingshead PG, Pitts-Meek S, Hansen S, Taylor R, Stewart TA. Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 1992;12:5541-7.
28. Balducci R, Toscano V, Pasquino AM, Mangiantini A, Municchi G, Armenise P, Terracina S, Prossomariti G, Boscherini B. Bone turnover and bone mineral density in young adult patients with panhypopituitarism before and after long-term growth hormone therapy. *Eur J Endocrinol*. 1995;132:42-6.
29. Barnard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology*. 1991;128:1459-64.
30. Baum HB, Biller BM, Finkelstein JS, Cannistraro KB, Oppenheim DS, Schoenfeld DA, Michel TH, Wittink H, Klibanski A. Effects of physiologic growth hormone therapy on bone density and body composition in patients with adult-onset growth hormone deficiency. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 1996;125:883-90.
31. Baylink DJ, Finkelstein RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res*. 1993;8 Suppl 2:S565-72.
32. Behringer RR, Lewin TM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL, D'Ercole AJ. Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology*. 1990;127:1033-40.
33. Bellino FL. Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause*. 2000;7:14-24.
34. Bengtsson BA, Eden S, Lonn L, Kvist H, Stokland A, Lindstedt G, Bosaeus I, Tolli J, Sjöström L, Isaksson OG. Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Feb;76:309-17.

35. Bengtsson BA, Johannsson G. The use of growth hormone in adults: a review of the last 10 years, the present and a perspective for the future. *Growth Horm IGF Res.* 1998;8 Suppl B:27-35. Review.
36. Benito López P, Corpas Jiménez MS. Efectos metabólicos de la administración de hormona de crecimiento. *Endocrinología.* 1991;38:247-53.
37. Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373:231-41.
38. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature.* 1986;319:516-8.
39. Beshyah SA, Kyd P, Thomas E, Fairney A, Johnston DG. The effects of prolonged growth hormone replacement on bone metabolism and bone mineral density in hypopituitary adults. *Clin Endocrinol.* 1995;42:249-54.
40. Beshyah SA, Shahi M, Skinner E, Sharp P, Foale R, Johnston DG. Cardiovascular effects of growth hormone replacement therapy in hypopituitary adults. *Eur J Endocrinol.* 1994;130:451-8.
41. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105:1663-8.
42. Bikle DD, Harris J, Halloran BP, Currier PA, Tanner S, Morey-Holton E. The molecular response of bone to growth hormone during skeletal unloading: regional differences. *Endocrinology.* 1995;136:2099-109.
43. Bikle DD, Sakata T, Halloran BP. The impact of skeletal unloading on bone formation. *Gravit Space Biol Bull.* 2003;16:45-54.
44. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press Inc;1996.
45. Bjursten LM, Emanuelson L, Ericson LE, Thomsen P. Method for ultrastructural studies of the intact tissue-metal interface. *Biomaterials.* 1990;11:596-601.
46. Blom EJ, Verheij JG, de Bleeck-Hogervorst JM, Di Silvio L, Klein CP. Cortical bone ingrowth in growth hormone-loaded grooved implants with calcium phosphate coatings in goat femurs. *Biomaterials.* 1998;19:263-70.
47. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Basle MJ, Chappard D. Bone loss and teeth. *Joint Bone Spine.* 2005;72:215-21.
48. Bogazzi F, Cosci C, Sardella C, Martino E, Gasperi M. Acromegaly: effects on bone metabolism and mass. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(10 Suppl):33-5.
49. Bohlooly-Y M, Olsson B, Bruder CE, Linden D, Sjogren K, Bjursell M, Eggecioglu E, Svensson L, Brodin P, Waterton JC, Isaksson OG, Sundler F, Ahren B, Ohlsson C, Oscarsson J, Tornell J. Growth hormone overexpression in the central nervous system results in hyperphagia-induced obesity associated with insulin resistance and dyslipidemia. *Diabetes.* 2005;54:51-62.
50. Bolanowski M, Daroszewski J, Medras M, Zadrozna-Sliwka B. Bone mineral density and turnover in patients with acromegaly in relation to sex, disease activity, and gonadal function. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:72-8.
51. Bonewald LF. Transforming growth factor-beta. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology.* San Diego, CA: Academic; 1996. p. 647-59.
52. Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. *Bone.* 1996;19:35-40.
53. Bord S, Ireland DC, Moffatt P, Thomas GP, Compston JE. Characterization of Osteoclin Expression in Human Bone. *J Histochem Cytochem.* 2005;27.D0I: 10.1369/jhc.4C6561. 2005.
54. Bostrom MPG, Lane JM, Berberian WS, Missri AAE, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM. Immunolocalization and expresion of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in fractures healing. *J Orthop Res.* 1995;13:357-67.
55. Bouillon R: Growth hormone and bone. *Horm Res.* 1991;36(suppl 1):49-55.
56. Boyce BF, Aufdemorte TB, Garret IR, Yates AJP, Mundy GR. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology.* 1989;125:1142-50.
57. Bravenboer N, Holzmann P, de Boer H, Roos JC, Van der Veen EA, Lips P. The effect of growth hormone on histomorphometric indices of bone structure and bone turnover in GH-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1818-22.
58. Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials.* 1997;18:235-42.
59. Brixen K, Kassem M, Eriksen EF, Nielsen HK, Flyvbjerg A, Mosekilde L. Growth hormone and adult bone remodeling: The potential use of GH in the treatment of osteoporosis. *J Pediatr Endocrinol.* 1993;6:65-71.
60. Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, Flyvbjerg A. A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. *J Bone Miner Res.* 1990;5:609-18.
61. Burdet L, de Murali B, Schutz Y, Pichard C, Fitting JW. Administration of growth hormone to underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, randomized, controlled study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1800-6.
62. Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone—their role in mechanotransduction. *J Nutr.* 1995;125 Suppl 7: S2020-3.
63. Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen TT. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *Eur J Orthod.* 2001;23:733-40.
64. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor-I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone culture. *J Clin Invest.* 1989;83:60-5.
65. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest.* 1988;81:1572-7.
66. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu Rev Med.* 1991;42:17-24.
67. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1989;18:903-18.
68. Canalis E. Skeletal growth factors. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis.* San Diego, CA: Academic; 1996. p. 261-79.
69. Cao T, Shiota T, Ohno K, Michi K. Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. *J Periodontal Res.* 2004;39:37-41.
70. Cao T, Shiota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi K. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Impl Res.* 2001;12:604-8.
71. Carlsson GE, Persson G. Morphologic changes of the mandible after extraction and wearing of dentures. A longitudinal, clinical, and x-ray cephalometric study covering 5 years. *Odontol Revy.* 1967;18:27-54. En: Mich CE. *Prótesis dental sobre implantes.* Elsevier España, S.A. 2006, Ed. En Español. Madrid. P:1-17.

72. Carmeliet G, Van Cromphaut S, Daci E, Maes C, Bouillon R. Disorders of calcium homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17:529-46.
73. Carrascosa A, Audi L. El cartilago de crecimiento. Regulación hormonal de su diferenciación. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. Retrasos del crecimiento. 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos SA; 1996. p. 119-26.
74. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanes F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.* 2006;35:34-41.
75. Castillo C, Cruzado M, Ariznavarreta C, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Cachofeiro V, Tresguerres JA. Effect of recombinant human growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old male Wistar rats. *Biogerontology.* 2005;6:303-12.
76. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev.* 1994;15:27-39.
77. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblasts enriched cultures from fetal rat parietal bone. *Endocrinology.* 1989;125:13-9.
78. Cheifetz S, Like G, and Massague J. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1986;261:9972-8.
79. Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007;28:1027-35. Epub 2006 Nov 13.
80. Chen Y, Shimizu M, Sato K, Koto M, Tsunemi K, Yoshida T, Yoshikawa Y. Effects of aging on bone mineral content and bone biomarkers in female cynomolgus monkeys. *Exp. Anim.* 2000;49:163-70.
81. Chen YM, Ho SC, Lam SS, Ho SS, Woo JL. Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4740-7.
82. Chenu C, Valentin-Opran A, Chavassieux P, Saez S, Meunier PJ, Delmas PD. Insulin-like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)₂ D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone.* 1990;11:81-6.
83. Chihara K, Sugimoto T. The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res.* 1997;48 Suppl 5:S45-9.
84. Chipman JJ, Zerwekh J, Nicari M, Marks J, Pak CJC. Effect of growth hormone administration: Reciprocal changes in serum 1a,25-dihydroxy-vitamin D and intestinal calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:321-4.
85. Choi JY, Kim HJ, Lee YC, Cho BO, Seong HS, Cho M, Kim SG. Inhibition of bone healing by pamidronate in calvarial bony defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:321-8. Epub 2006 Oct 27.
86. Chow J, Lean JM, Chambers TJ. 17β-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology.* 1992;130:3025-32.
87. Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest.* 1992;89:74-8.
88. Chu LW, Lam KS, Tam SC, Hu WJ, Hui SL, Chiu A, Chiu KC, Ng P. A randomized controlled trial of low-dose recombinant human growth hormone in the treatment of malnourished elderly medical patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1913-20.
89. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest.* 1993;91:1888-96.
90. Clemente C, Tabuenca r, Rodríguez-Torres R, Fernández-Valencia R, Carrascosa-Sánchez J, Gómez-Pellico L. Influence of osteoporosis on osseointegration: an experimental study. *Eur J Anat.* 2000;4:61-7.
91. Clockie CML, Warshawsky H. Development of a rat tibia model for morphological studies of the interface between bone and a titanium implant. *Compendium.* 1995;16:56-66.
92. Cobo T, Hernández A, Torrijos A. Técnicas para la valoración de la masa ósea en la osteoporosis. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento. Madrid: Médica Panamericana; 2003. p. 31- 40.
93. Compston JE, Mellish RWE, Garrahan NJ, Croucher PI. Structural mechanisms of trabecular bone loss in man. *Bone Miner.* 1989;6:339-50.
94. Compston JE, Mellish RWE, Garrahan NJ, Croucher PI. Structural mechanisms of trabecular bone loss in normal subjects. In: Takahashi HE, ed. Bone Morphometry. Proceedings of the Fifth, International Congress on Bone Morphometry. Tokyo: Nishimura; 1990. p. 371-4.
95. Compston JE. Histomorphometric manifestations of age-related bone loss. In: Rosen C, Glowacki J, Bilezikian J, eds. The Aging Skeleton. San Diego, CA: Academic; 1999. p. 251-61.
96. Compston JE. Sex Steroids and Bone. *Physiol Rev.* 2001;81:419-47.
97. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop.* 1995;313:8-18.
98. Conover CA. The role of insulin-like growth factors and binding proteins in bone cell physiology. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego, CA: Academic; 1996. p. 607-18.
99. Cook DM, Ludlam WH, Cook MB. Route of estrogen administration helps to determine growth hormone (GH) replacement dose in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3956-60.
100. Cooke JW, Sarment DP, Whitesman LA, Miller SE, Jin Q, Lynch SE, Giannobile WV. Effect of rhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. *Tissue Eng.* 2006;12:1441-50.
101. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Señaris R, Devesa J, Arce VM. Activation of Growth Hormone Receptor delivers an antiapoptotic signal: Evidence for a role of Akt in this pathway. *Endocrinology.* 1999;140:5937-43.
102. Costoya JA, Ríos R, García-Barros M, Gallego R, García-Caballero T, Senaris R, Arce VM, Devesa J. Role of growth hormone receptor in HL-60 cell survival. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;4:26-31.
103. Cranney A, Guyatt G, Griffith L, Wells G, Tugwell P, Rosen C, the Osteoporosis Methodology Group, and the Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IX: Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev.* 2002;23:570-8.
104. Cummings SR. LIFT study is discontinued. *BMJ.* 2006;332:667.
105. Cuneo RC, Salomon F, Wilmhurst P, Byrne C, Wiles CM, Hesp R. Cardiovascular effects of growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults: stimulation of the renin-aldosterone system. *Clin Sci.* 1991;81:587-92.
106. Cuttica CM, Castoldi L, Gorrini GP, Peluffo F, Delitala G, Filippa P, Fanciulli G, Giusti M. Effects of six-month administration of recombinant human growth hormone to healthy elderly subjects. *Aging (Milano).* 1997;9:193-7.
107. Dal Mas I, Biscardi A, Ripamonti U. Comparison of two Hologic DXA systems (QDR 1000 and QDR 4500/A) for in vivo bone mass measurement in the baboon (*Papio ursinus*). *J Clin Densitom.* 2002;5:313-8.

108. Dao TT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants?. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993 8:137-44.
109. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*. 1989;10:68-91.
110. Davis JE, ed. Bone engineering. Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
111. de la Mata J, Uy H, Guise TA, Story B, BBF, Mundy GR, Roodman GD. Il-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by PTH-rP in vivo. *J Clin Invest*. 1995;95:2846-52.
112. De Souza MJ, Miller BE, Sequenzia LC, Luciano AA, Ulreich S, Stier S, Prestwood K, and Lasley BL. Bone health is not affected by luteal phase abnormalities and decreased ovarian progesterone production in female runners. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2867-76.
113. Dedhar S, Gaboury L, Galloway P, Eaves C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origino. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:9253-7.
114. Degerblad M, Bengtsson BA, Bramnert M, Johnell O, Manhem P, Rosen T, Thoren M. Reduced bone mineral density in adults with GH deficiency: Increase bone turnover during 12 months of GH substitution therapy. *Eur J Endocrinol*. 1995;133:180-8.
115. Degerblad M, Elgindy N, Hall K, Sjoberg HE, Thoren M. Potent effect of recombinant growth hormone on bone mineral density and body composition in adults with panhypopituitarism. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1992;126:387-93.
116. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:92-102. Review.
117. Devesa J, Barros MG, Gondar M, Tresguerres JA, Arce V. Regulation of hypothalamic somatostatin by glucocorticoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53:227-82.
118. Devesa J, Esquifino A, Tresguerres JAF. Hormonas adenohipofisarias. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 1992. p. 913-27.
119. Devesa J, García Barros M, Costoya JA, Gondar M, Gavrilina T, Gavrilin M, Arce V. Expresión de los genes de hormona de crecimiento, variantes moleculares y acciones biológicas de estas variantes. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. *Retrasos del crecimiento*. 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos S.A.; 1996. p. 29-44.
120. Devogelaer JP. A review of the effects of tibolone on the skeleton. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5:941-9.
121. Deyhim F, Smith BJ, Soung do Y, Juma S, Devareddy L, Arjmandi BH. Ipriflavone modulates IGF-I but is unable to restore bone in rats. *Phytother Res*. 2005;19:116-20.
122. Díaz MJ, Devesa J. Expresión del gen de hormona de crecimiento: variantes moleculares y actividad biológica de estas variantes. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. *Retrasos del crecimiento, fisiopatología*. Madrid: Díaz de Santos SA; 1992.p.17-34.
123. Dieguez C, Dominguez F, Casanueva F. Factores de crecimiento y oncogenes. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España;1992. p. 939-46.
124. Doga M, Bonadonna S, Gola M, Mazziotti G, Nuzzo M, Giustina A. GH deficiency in the adult and bone. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(8 Suppl):18-23. Review.
125. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Saege-Schiff technique. *J Oral Pathol*. 1982;11:318-20.
126. Downes S, Clifford CJ, Scotchford C, Klein CP. Comparison of the release of growth hormone from hydroxyapatite, heat-treated hydroxyapatite, and fluoroapatite coatings on titanium. *J Biomed Mater Res*. 1995;29:1053-60.
127. Downes S, Wood DJ, Malcolm AJ, Ali SY. Growth hormone in polymethylmethacrylate cement. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;252:294-8.
128. Duarte PM, Cesar Neto JB, Goncalves PF, Sallum EA, Nociti FH. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *Implant Dent*. 2003;12:340-6.
129. Duarte PM, Conclaves PF, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Age-related and surgically induced estrogen deficiencies may differently affect bone around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2005;76:1496-501.
130. Durham SK, Kiefer MC, Riggs BL, Conover CA. Regulation of insulin-like growth factor binding protein 4 proteinase in normal human osteoblast-like cells: implications in bone cell physiology. *J Bone Miner Res*. 1994;9:111-7.
131. Eckardt H, Bundgaard Kg, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hvid I. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. *J Orthop Res*. 2003;21:335-40.
132. Eden Engstrom B, Burman P, Johansson AG, Wide L, Karlsson FA. Effects of short-term administration of growth hormone in healthy young men, women, and women taking oral contraceptives. *J Intern Med*. 2000;247:570-8.
133. Eden Engstrom B, Karlsson FA, Naessen T, Gillberg P, Wide L. Ambulatory morning growth hormone concentrations increase in men and decrease in women with age. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62:25-31.
134. Eder A, Watzek G. Treatment of a patient with sever osteoporosis and chronic polyarthritis with fixed implant-supported prosthesis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14:587-90.
135. Edwards M, Sarma U, Flanagan AM. Macrophage Colony-Stimulating Factor increases bone resorption by osteoclasts disaggregated from human fetal long bones. *Bone*. 1998;22:325-9.
136. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology*. 1989;125:825-33.
137. Ernst M, Rodan GA. Estradiol regulation of insulin-like growth factor-I expression in osteoblastic cells: evidence for transcriptional control. *Mol Endocrinol*. 1991;5:1081-9.
138. Ernst M, Rodan GA. Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH): positive correlation with the presence of the GH-induced IGF-binding protein BP-3. *Endocrinology*. 1990;127:807-14.
139. Eschen C, Andreassen TT. Growth hormone normalizes vertebral strength on ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1995;57:392-6.
140. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Glüer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA*. 1999;282:637-45. Erratum in: *JAMA* 1999 Dec 8;282(22):2124.
141. Faibish D, Gomes A, Boivin G, Binderman I, Boskey A. Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone*. 2005;36:6-12. Epub 2004 Nov 24.

142. Faulkner KG, Gluer CC, Majumdar S, Lang P, Engelke K, Genant HK. Noninvasive measurements of bone mass, structure, and strength: current methods and experimental techniques. *AJR Am J Roentgenol*. 1991;157:1229-37. Review.
143. Fernández-García D, Alonso G, Muñoz-Torres M. Tratamiento anabólico en la osteoporosis. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:341-5.
144. Feyen JHM, Elford P, Dipadova FE, Trechsel U. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*. 1989;4:633-8.
145. Fielder PJ, Mortensen DL, Mallet P, Carlsson B, Baxter RC, Clark RG. Differential long-term effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) growth hormone (GH), and IGF-I plus GH on body growth and IGF binding proteins in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. 1996 May;137(5):1913-20.
146. Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Torricelli P, Morrone G, Guzzardella GA, Giardino R, Krajewski A, Ravaglioli A, Belmonte MM, Benedittis AD, Biagini G. The effect of osteopenia on the osteointegration of different biomaterials: histomorphometric study in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2000;11:579-85.
147. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother*. 2004;58:487-93.
148. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Krajewski A, Ravaglioli A, Belmonte MM, Biagini G, Giardino R. Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2001;83:139-43.
149. Fini M, Nicoli Aldini N, Gandolfi MG, Mattioli Belmonte M, Giavaresi G, Zucchini C, De Benedittis A, Amati S, Ravaglioli A, Krajewski A, Rocca M, Guzzardella GA, Biagini G, Giardino R. Biomaterials for orthopedic surgery in osteoporotic bone: a comparative study in osteopenic rats. *Int J Artif Organs*. 1997;20:291-7.
150. Franchi M, Bacchelli B, Giavaresi G, De Pasquale V, Martini D, Fini M, Giardino R, Ruggeri A. Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. *J Periodontol*. 2007;78:879-88.
151. Franzen P, Ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz H, Heldin P, and Miyazono K. Cloning of a TGF- β type 1 receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell*. 1993;75:681-92.
152. Friberg B, Ekstubbé A, Mellström D, Sennérby L. Brånemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001;3:50-6.
153. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976;47:327-59. Review. En Sodeck J, Cheifetz S. Molecular regulation of osteogenesis. En Davis JE, ed. *Bone engineering*. Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
154. Frost HM. A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod*. 2004;74:3-15. Review.
155. Frost HM. The regional acceleratory phenomenon. Intermediary organization of the skeleton. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, II:109-129, 1986.
156. Frost HM. The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1992;7:253-61. Review
157. Fujimoto T, Niimi A, Nakai H, Ueda M. Osseointegrated implants in a patient with osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:539-42.
158. Fujimoto T, Niimi A, Sawai T, Ueda M. Effects of steroid-induced osteoporosis on osseointegration of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:183-9.
159. Fukayama S, Tashjian AH Jr. Direct modulation by estradiol of the response of human bone cells (SaOS-2) to human parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology*. 1989;124:397-401.
160. Gallagher JC, Satpathy R, Rafferty K, Haynatzka V. The effect of soy protein isolate on bone metabolism. *Menopause*. 2004;11:290-8.
161. García-Barros M, Costoya JA, Ríos R, Arce V, Devesa J. N-glycosylated variants of growth hormone in human pituitary extracts. *Hor Res*. 2000;53:40-5.
162. Gehron Robey P, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res*. 1993;8 Suppl 2:S483-7.
163. Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med*. 1999;5:623-8.
164. Ghiron LJ, Thompson JL, Holloway L, Hintz RL, Butterfield GE, Hoffman AR, Marcus R. Effects of recombinant insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone turnover in elderly women. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1844-52.
165. Giavaresi G, Branda F, Causa F, Luciani G, Fini M, Nicoli Aldini N, Rimondini L, Ambrosio L, Giardino R. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) biomimetic coating to improve osseointegration of a PMMA/HA/glass composite implant: in vivo mechanical and histomorphometric assessments. *Int J Artif Organs*. 2004;27:674-80.
166. Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhart S, Burnand KG, Salomon F, Sonksen PH, Russell-Jones D. The effects of 10 years of recombinant human growth hormone in adult GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2596-602.
167. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin 11: A new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest*. 1994;93:1516-24.
168. Giustina A, Bussi AR, Jacobello C, Wehrenberg WB. Effects of recombinant human growth hormone (GH) on bone and intermediary metabolism in patients receiving chronic glucocorticoid treatment with suppressed endogenous GH response to GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:122-9.
169. Glassman SD, Carreon L, Djurasovic M, Campbell MJ, Puno RM, Johnson JR, Dimar JR. Posterolateral lumbar spine fusion with INFUSE bone graft. *Spine J*. 2007;7:44-9. Epub 2006 Nov 20.
170. Glassman SD, Dimar JR, Carreon LY, Campbell MJ, Puno RM, Johnson JR. Initial fusion rates with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix and a hydroxyapatite and tricalcium phosphate/collagen carrier in posterolateral spinal fusion. *Spine*. 2005;30:1694-8.
171. Goel HL, Moro L, King M, Teider N, Centrella M, McCarthy TL, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Marra E, Languino LR. Beta1 integrins modulate cell adhesion by regulating insulin-like growth factor-II levels in the microenvironment. *Cancer Res*. 2006;66:331-42.
172. Goff JP, Caperna TJ, Steele NC. Effects of growth hormone administration on vitamin D metabolism and vitamin D receptors in the pig. *Domest Anim Endocrinol*. 1990;7:425-33.
173. Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Stimulation of bone resorption in vitro by a non-prostanoid factor released by human monocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1983;762:471-4.
174. Gowen M, Wood DD, Mundy GR, Russell RGG. Studies on the actions of interleukin-1 on bone metabolism: IL-1 stimulation of bone cell proliferation, and inhibition of IL-1 induced bone resorption by interferon gamma. *Br J Rheumatol*. 1985;24:147-9.

175. Gowen M, Wood DD, Russell RG. Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity. *J Clin Invest.* 1985;75:1223-9.
176. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 years experience. *Laboratory animals.* 1981;15:163-70.(artículo)
177. Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation.* 1985;29:195-8. Review.
178. Grobbee DE, LIFT Steering Committee. LIFT study to continue as planned. *BMJ.* 2005;331:843. [Carta].
179. Guglielmi G. Quantitative computed tomography (QCT) and dual X-ray absorptiometry (DXA) in the diagnosis of osteoporosis. *Eur J Radiol.* 1995;20:185-7.
180. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Heymann D, Pilet P, Couillaud S, Faivre A, Daculsi G. Growth hormone-loaded macroporous calcium phosphate ceramic: in vitro biopharmaceutical characterization and preliminary in vivo study. *J Biomed Mater Res.* 1998;40:560-6.
181. Guise TA, Garrett IR, Bonewald LF, Mundy GR. The interleukin-1 receptor antagonist inhibits hypercalcemia mediated by interleukin-1. *J Bone Miner Res.* 1993;8:583-8.
182. Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4889-93.
183. Hagiwara S, Lane N, Engelke K, Sebastian A, Kimmel DB, Genant HK. Precision and accuracy for rat whole body and femur bone mineral determination with dual X-ray absorptiometry. *Bone Miner.* 1993;22:57-68.
184. Haguenaer D, Welch V, Shea B, Tugwell P, Adachi JD, Wells G. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2000;11:727-38.
185. Haguenaer M, Whitford GM, Clark MK, Jannausch ML. Elevated serum fluoride concentrations in women are not related to fractures and bone mineral density. *J Nutr.* 2005;135:2247-52.
186. Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg Am.* 1952;24-A-3:701-28.
187. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature.* 1990;343:336-40.
188. Hansen TB, Brixen K, Vahl N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Mosekilde L, Hagen C. Effects of 12 months of growth hormone (GH) treatment on calciotropic hormones, calcium homeostasis, and bone metabolism in adults with acquired GH deficiency: a double blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3352-9.
189. Hayashi K, Uenoyama K, Mashima T, Sugioka Y. Remodelling of bone around hydroxyapatite and titanium in experimental osteoporosis. *Biomaterials.* 1994;15:11-6.
190. Heald AH, Karvestedt L, Anderson SG, McLaughlin J, Knowles A, Wong L, Grill V, Cruickshank JK, White A, Gibson JM, Brismar K. Low insulin-like growth factor-II levels predict weight gain in normal weight subjects with type 2 diabetes. *Am J Med.* 2006;119:167.e9-15.
191. Hedner E, Linde A, Nilsson A. Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranes: an experimental study in rats. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1952-60.
192. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin like growth factor-I and II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology.* 1995;136:124-31.
193. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology.* 1988;122:254-60.
194. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem.* 1998;273:31327-36.
195. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DI, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;16:2-12.
196. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DI, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology.* 1999;140:4367-70.
197. Holder AT, Spencer EM, Preece MA. Effect of bovine growth hormone and a partially pure preparation of somatomedin on various growth parameters in hypopituitary dwarf mice. *J Endocrinol.* 1981;89:275-82.
198. Holloway L, Butterfield G, Hintz RL, Gesundheit N, Marcus R. Effect of recombinant human growth hormone on metabolic indices, body composition, and bone turnover in healthy elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:470-9.
199. Holmes SJ, Whitehouse RW, Swindell R, Economou G, Adams JE, Shalet SM. Effect of growth hormone replacement on bone mass in adults with adult onset growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol.* 1995;42:627-33.
200. Hopper JL, Seeman E. The bone density of female twins discordant for tobacco use. *N Engl J Med.* 1994;330:387-92.
201. Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H, Orimo H. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int.* 2000;11:721-4.
202. Horner A, Bishop NJ, Bord S, Beeton C, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE. Immunolocalisation of vascular endothelial - growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J Anat.* 1999;194:519-24.
203. Horton MA, Taylor ML, Arnett TR, Helfrich MH. Arg-gly-aspartate (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptor antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts. *Exp Cell Res.* 1991;195:368-75.
204. Hotchkiss CE. Use of peripheral quantitative computed tomography for densitometry of the femoral neck and spine in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone.* 1999;24:101-7.
205. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nature Med.* 1996;2:1132-6.
206. Hurley MM, Lee SK, Raisz LG, Bernecker P, Lorenzo J. Basic Fibroblast Growth Factor induces osteoclasts formation in murine bone marrow cultures. *Bone.* 1998;22:309-16.
207. Iezzi G, Degidi M, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A. Bone response to submerged, unloaded implants inserted in poor bone sites: a histological and histomorphometrical study of 8 titanium implants retrieved from man. *J Oral Implantol.* 2005;31:225-33.
208. Iglesias P, Díez JJ, Gómez-Pan A. Empleo terapéutico de la hormona de crecimiento en adultos. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, ed. *Retrasos del crecimiento* Madrid: 2ª Ed. Díaz de Santos SA; 1996. p. 377-95.
209. Ikeda S, Morishita Y, Tsutsumi H, Ito M, Shiraishi A, Arita S, Akahoshi S, Narusawa K, Nakamura T. Reductions in bone turnover, mineral, and structure associated with mechanical properties of lumbar vertebra and femur in glucocorticoid-treated growing minipigs. *Bone.* 2003;33:779-87.
210. Isaksson OGP, Janson JO, Gausse IAM. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science.* 1982;216:1237-9.
211. Isaksson OGP, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. Action of growth hormone: Current views. *Acta Paediatr Scand.* 1988;343:12-8.

212. Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson JO, Isaksson OGP. Effects of local administration of GH and IGF-I on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol*. 1986;250:E367-72.
213. Ishibe M, Nojima T, Ishibashi T, Koda T, Kaneda K, Rosier RN, Puzas JE. 17 beta-estradiol increases the receptor number and modulates the action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteosarcoma-derived osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*. 1995;57:430-5.
214. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;16. [Epub ahead of print]
215. Jandinski JJ. Osteoclasts activating factor is now interleukin-1 beta: historical perspective and biological implications. *J Oral Pathol*. 1988;17:145-52.
216. Jeffcoat MK, Chesnut CH. Systemic osteoporosis and oral bone loss: Evidence shows increased risk factors. *J Am Dent Assoc*. 1993;124:49-56.
217. Jeffcoat MK, Reddy MS, Wang IC, Meuninhoff LA, Farmer JB, Koth DL. The effect of systemic flurbiprofen on bone supporting dental implants. *J Am Dent Assoc*. 1995;126:305-11.
218. Jilka RL, Hancog G, Giarasole G, Passeri G, Williams DG, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclasts development after estrogen loss: Mediation by Interleukin-6. *Science*. 1992;257:88-91.
219. Jilka RL, Passeri G, Giarasole G, Cooper S, Abrams J, Broxmeyer H, Manolagas SC. Estrogen loss upregulates hematopoiesis in the mouse: a mediating role of IL-6. *Exp Hematol*. 1995;23:500-6.
220. Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, Williams DC, Roberson PK, Manolagas SC. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J Clin Invest*. 1998;101:1942-50.
221. Jilka RL. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: A 1998 update. *Bone*. 1998;23:75-81.
222. Jódar Gimeno E, Muñoz-Torres M, Escobar-Jiménez F, Quesada Charneco M, Luna del Castillo JD, Olea N. Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hyperthyroidism: Role of biological markers of bone turn-over. *Calcif Tissue Int*. 1997;61:370-6.
223. Johansson G, Grimby G, Sunnerhagen KS, Bengtsson B-A. Two years of growth hormone (GH) treatment increase isometric and isokinetic muscle strength in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2877-84.
224. Johansen JS, Pedersen SA, Jorgensen JO, Riis BJ, Christiansen C, Christiansen JS, Skakkebaek NE. Effects of growth hormone (GH) on plasma bone Gla protein in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:916-9.
225. Johansson AG, Burman P, Westermark K, Ljunghall S. The bone mineral density in acquired growth hormone deficiency correlates with circulating levels of IGF-I. *J Intern Med*. 1992;232:447-52.
226. Johansson AG, Lindh E, Blum WF, Kollerup G, Sorensen OH, Ljunghall S. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I in men with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996a;81:44-8.
227. Johansson G, Rosen T, Bosaeus I, Sjöström L, Bengtsson BA. Two years of growth hormone treatment increases bone mineral content and density in hypopituitary patients with adult-onset GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996b;81:2865-73.
228. Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD. Tumours producing human TNF induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology*. 1989;124:1424-7.
229. Johnston CC Jr, Bjarnason NH, Cohen FJ, Shah A, Lindsay R, Mitlak BH, et al. Long-term effects of raloxifene on bone mineral density, bone turnover, and serum lipid levels in early postmenopausal women: three-year data from 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Arch Intern Med*. 2000;160:3444-50.
230. Jorgensen JOL, Pedersen SA, Thuesen L, Jorgensen J, Ingemann-Hansen T, Skakkebaek EN, Christiansen JS. Beneficial effects of growth hormone treatment in GH-deficient adults. *Lancet*. 1989;1:1221-5.
231. Jorgensen PH, Bak B, Andreassen TT. Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. *Bone*. 1991;12:353-9.
232. Jux C, Leiber K, Hugel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O. Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology*. 1998;139:3296-305.
233. Kahn A, Gibbons R, Perkins S, Gazit D. Age-related bone loss. A hypothesis and initial assessment in mice. *Clin Orthop*. 1995;313:69-75.
234. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*. 1989;124:7-16.
235. Kanis JA. Osteoporosis Blackwell Science Ltd. Oxford, 1996.
236. Karsdal MA, Andersen TA, Bonewald L, Christiansen C. Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA Cell Biol*. 2004;23:155-65.
237. Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaisse JM, Foged NT. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;277:44061-7.
238. Karsenty G. Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*. 2001;142: 2731-3.
239. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksson EF. GH stimulates the proliferation and differentiation of normal osteoblast like cells in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1993;52:222-6.
240. Kassem M, Mosekilde L, Eriksson EF. Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. *Growth Regulation*. 1994;4:131-5.
241. Kassem M. Cellular and molecular effects of growth hormone and estrogen on human bone cells. *APMIS Suppl*. 1997; 71:1-30.
242. Kaufman JM, Taelman P, Vermeulen A, Vandeweghe M. Bone mineral status in growth hormone-deficient males with isolated and multiple pituitary deficiencies of childhood onset. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74:118-23.
243. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop*. 1995;313:36-46.
244. Kember NF, Walker KV. Control of bone growth in rats. *Nature*. 1971;229:428-9.
245. Kidder LS, Schmidt IU, Evans GL, Turner RT. Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats. *Calc Tissue Int*. 1997;61:327-35.
246. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem*. 1996;271:28890-7.

247. Klein GL, Wolf SE, Langman CB, Rosen CJ, Mohan S, Keenan BS, Matin S, Steffen C, Nicolai M, Sailer DE, Herndon DN. Effects of therapy with recombinant human growth hormone on insulin-like growth factor system components and serum levels of biochemical markers of bone formation in children after severe burn injury. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:21-4.
248. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris).* 2005;53:576-80. Epub 2005 Jan 28. Review.
249. Koea JB, Breier BH, Douglas RG, Gluckman PD, Shaw JHF. Anabolic and cardiovascular effects of recombinant human growth hormone in surgical patients with sepsis. *Br J Surg.* 1996;83:196-202.
250. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, Flyvbjerg A, Haas N, Raschke M. Homologous growth hormone accelerates bone healing--a biomechanical and histological study. *Bone.* 2003;33:628-37.
251. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson H, Gao RT, Inada M, Sato M, Okamoto , Kitamiura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89:755-64.
252. Kong YY, Penninger JM. Molecular control of bone remodelling and osteoporosis. *Exp Gerontol.* 2000;35:947-56.
253. Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi L, Tan I, Timms E, Caparelli C, Morony S, Oliveira-Dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999;397:315-23.
254. Kopple JD, Brunori G, Leiserowitz M, Fouque D. Growth hormone induces anabolism in malnourished maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:952-8. Epub 2005 Mar 8.
255. Koshiyama H, Nakamura Y, Tanaka S, Minamikawa J. Decrease in carotid intima-media thickness after 1-year therapy with etidronate for osteopenia associated with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2793-6.
256. Kotzmann H, Bernecker P, Hubsch P, Pietschmann P, Woloszczuk W, Svoboda T, Geyer G, Luger A. Bone mineral density and parameters of bone metabolism in patients with acromegaly. *J Bone Miner Res.* 1993;8:459-65.
257. Kremer M, Judd J, Rifkin B, Ausmann J, Oursler MJ. Estrogen modulation of osteoclast lysosomal enzyme secretion. *J Cell Biochem.* 1995;57:271-9.
258. Kurihara N, Chenu C, Miller M, Civin C, Roodman GD. Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology.* 1990;126:2733-41.
259. La Croix AZ, Ott SM, Ichikawa L, Scholes D, Barlow WE. Low dose hydrochlorothiazide and preservation of bone mineral density in older adults. *Ann Intern Med.* 2000;133:519-26.
260. Lakkakorpi PT, Vaananen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 1995;32:171-81.
261. Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding proteins: structural and molecular relationships. *Growth Factors.* 1991;5:19-28.
262. Lanes R, Gunczler P, Paoli M, Weisinger JR. Bone mineral density of prepubertal age girls with Turner's syndrome while on growth hormone therapy. *Horm Res.* 1995;44:168-71.
263. Landin-Wilhelmsen K, Nilsson A, Bosaeus I, Bengtsson BA. Growth hormone increases bone mineral content in postmenopausal osteoporosis: a randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res.* 2003;18:393-405.
264. Lang P, Steiger P, Faulkner K, Gluer C, Genant HK. Osteoporosis. Current techniques and recent developments in quantitative bone densitometry. *Radiol Clin North Am.* 1991;29:49-76. Review.
265. Langdahl BL, Kassem M, Moller MK, Eriksen EF. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:176-83.
266. Langer, 1993
267. Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993;53 Suppl 1:S102-7.
268. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993;53 Suppl 1:S102-6; discussion S106-7. Review
269. Lau KH, Kapur S, Kesavan C, Baylink DJ. Upregulation of the WNT, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *J Biol Chem.* 2006 Feb 3. Epub ahead of print.
270. Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, Chow JW. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995;268:E318-27.
271. Leung K, Rajkovic IA, Peters E, Markus I, Van Wyk JJ, Ho KK. Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action. *Endocrinology.* 1996;137:2694-702.
272. Lewinson D, Shenzer P, Hochberg Z. Growth hormone involvement in the regulation of tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells that are active in cartilage and bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 1993;52:216-21.
273. Li L, Pettit AR, Gregory LS, Forwood MR. Regulation of bone biology by prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS): A rose by any other name... *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Feb 3. Epub ahead of print.
274. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1997;20:55-61.
275. Lian JB, Stein GS. The developmental stages of osteoblasts growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF- β_1) and hormones (vitamin D and glucocorticoids). *J Oral Implantol XIX.* 1993;2:95-105.
276. Lieberman SA, Holloway L, Marcus R, Hoffman AR. Interactions of growth hormone and parathyroid hormone in renal phosphate, calcium, and calcitriol metabolism and bone remodeling in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 1994; 9:1723-8.
277. Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS.* 1995;103:140-6.
278. Lombardi G, Tauchmanova L, Di Somma C, Musella T, Rota F, Savanelli MC, Colao A. Somatopause: dimetabolic and bone effects. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(10 Suppl):36-42.
279. Lugo GG, de Falco Caparbo V, Guzzo ML, Konig B Jr, Jorgetti V. Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent.* 2000;9:303-9.
280. Ma T, Nelson ER, Mawatari T, Oh KJ, Larsen DM, Smith RL, Goodman SB. Effects of local infusion of OP-1 on particle-induced and NSAID-induced inhibition of bone ingrowth in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79:740-6.
281. Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA. Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76:713-21.
282. Mann DR, Rudman CG, Akinbami MA, Gould KG. Preservation of bone mass in hypogonadal female monkeys with recombinant human growth hormone administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74:1263-9.
283. Maor G, Hochberg Z, van der Mark K, Heinigard D, Silbermann M. Human growth hormone enhances chondrogenesis and osteogenesis in a tissue culture system of chondroprogenitor cells. *Endocrinology.* 1989;125:1239-45.

284. Marcelli C, Yates AJP, and Mundy GR. In vivo effects of human recombinant transforming growth factor beta on bone turnover in normal mice. *J Bone Miner Res.* 1990;5:1087-96.
285. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron.* 2005;36:630-44.
286. Marcus R, Butterfield G, Holloway L, Gilliland L, Baylink DJ, Hintz RL, Sherman BM. Effects of short term administration of recombinant growth hormone to elderly people. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70:9-527.
287. Markussis V, Beshyah SA, Fisher C, Sharp P, Nicolaides AN, Johnston DG. Detection of premature atherosclerosis by high-resolution ultrasonography in symptom-free hypopituitary adults. *Lancet.* 1992;340:1188-92.
288. Martha Jr PM: Human growth hormone binding-proteins: Function and interest in human growth abnormalities. *Anal Esp Ped.* 1994;58:24-7.
289. Martha PM Jr, Reiter EO, Davila N, Shaw MA, Holcombe JH, Baumann G. Serum growth hormone (GH)-binding-protein/receptor: an important determinant of GH responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:1464-9.
290. Martha PM Jr, Rogol AD, Carlsson LM, Gesundheit N, Blizzard RM. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys I. Serum growth hormone-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:452-7.
291. Martínez DA, Orth MW, Carr KE, Vanderby R Jr, Vilas AC: Cortical bone growth and maturational changes in dwarf rats induced by recombinant human growth hormone. *Am J Physiol.* 1996;270:51-9.
292. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Biphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1567-75.
293. McCarthy TL, Casinghino S, Centrella M, Canalis E. Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandin E2, growth hormone, and the insulin-like growth factors. *J Cell Physiol.* 1994;160:163-75.
294. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Regulatory effects of insulin-like growth factor I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology.* 1989;124:301-9.
295. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop.* 2007;31:729-34. Epub 2007 Jul 17.
296. Mich CE. Prótesis dental sobre implantes. Elsevier España, S.A. 2006. Ed. En Español. Madrid. P:1-17
297. Miller PD, Zapalowski C, Kulak CAM, Bilezikian JP. Bone densitometry: The best way to detect osteoporosis and to monitor therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1867-71.
298. Milovancev M, Muir P, Manley PA, Seeherman HJ, Schaefer S. Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in 4 dogs. *Vet Surg.* 2007;36:132-40.
299. Minegishi T, Kawamoto K, Yamada Y, Oshikawa M, Kishida M, Sato S, Ito K. Effects of ipriflavone on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvaria. *J Oral Sci.* 2002;44:7-11.
300. Minsk L, Polson AM. Dental implant outcomes in postmenopausal women undergoing hormone replacement. *Compend Contin Educ Dent.* 1998;19:859-62.
301. Miyaniishi K, Trindade MC, Ma T, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Periprosthetic osteolysis: induction of vascular endothelial growth factor from human monocyte/macrophages by orthopaedic biomaterial particles. *J Bone Miner Res.* 2003;18:1573-83.
302. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K, Kumegawa M. IGF-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology.* 1992;131:1075-80.
303. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop.* 1991;263:30-48.
304. Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser V, Dony C, Lang K, Bayunk DJ. Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem.* 1995;35:20424-31.
305. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G. Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 1993;273:279-86.
306. Morey ER, Baylink JJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science.* 1978;201:1138-41.
307. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:351-61.
308. Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN. Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone.* 1998;23:343-52.
309. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* 1997;89:774-9.
310. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S505-10.
311. Mundy GR. Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Regulation.* 1993;3:124-8.
312. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res.* 1991;26:213-7.
313. Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop.* 1995;313:19-26.
314. Nagaya N, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary-associated cachexia. *Intern Med.* 2006;45:127-34. Epub 2006 Mar 1.
315. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Lin H, Maastricht S, Swain M, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone.* 2001;28:80-6.
316. Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:218-23.
317. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effects of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994;15:203-8.
318. Neugebauer J, Traini T, Thams U, Piattelli A, Zoller JE. Peri-Implant Bone Organization Under Immediate Loading State. Circularly Polarized Light Analyses: A Minipig Study. *J Periodontol.* 2006;77:152-60.
319. Newman E, Turner AS, Walk JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone.* 1995;16:277S-84S.
320. Nielsen HM, Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand.* 1991;62:244-7.
321. Nijweide PJ, Burger EH, Nulend JK, Van Der Plas A. The osteocyte. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology.* San Diego, CA: Academic; 1996. p. 115-26.
322. Nilsson A, Swolin D, Enerback S, Ohlsson C. Expression of functional growth hormone receptors in cultured human osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3483-8.
323. Nilsson AG. Effects of growth hormone replacement therapy on bone markers and bone mineral density in growth hormone-deficient adults. *Horm Res.* 2000;54 Suppl 1:52-7. Review.

324. Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatani M, Kobayashi T, Chihara K. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclasts differentiation. *Endocrinology*. 1996;137:35-41.
325. Noda M and Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor beta. *Endocrinology*. 1989;124:2991-4.
326. Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Biscardi A, Buffenstein R. Validation and application of dual-energy X-ray absorptiometry to measure bone mineral density in rabbit vertebrae. *J Clin Densitom*. 2000;3:49-55.
327. Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Buffenstein R. Calcium metabolism and bone mass in female rabbits during skeletal maturation: Effects of dietary calcium intake. *Bone*. 2001;29:62-9.
328. Nutrient Requirements of Rabbits. Second revised edition. National Academy of Sciences. Washington DC. 1977.(artículo)
329. Oda H, Nakamura K, Matsushita T, Yamamoto S, Ishibashi H, Yamazaki T, Morimoto S. Clinical use of a newly developed calcium phosphate cement (XSB-671D). *J Orthop Sci*. 2006;11:167-74.
330. O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW, Holmes SJ, Adams JE, Shalet SM. Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:1344-8.
331. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*. 1993;64:432-44.
332. Ohira Y, Kawano F, Wang XD, Sudoh M, Iwashita Y, Majima HJ, Nonaka I. Irreversible morphological changes in leg bone following chronic gravitational unloading of growing rats. *Life Sci*. 2006; Mar 6. Epub ahead of print.
333. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev*. 1998;19:55-79. Review.
334. Ohlsson C, Isaksson O, Lindahl A. Clonal analysis of rat tibia growth plate chondrocytes in suspension culture--differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I. *Growth Regul*. 1994;4:1-7.
335. Ohlsson C, Sjogren K, Jansson JO, Isaksson OG. The relative importance of endocrine versus autocrine/paracrine insulin-like growth factor-I in the regulation of body growth. *Pediatr Nephrol*. 2000;14:541-3.
336. Okamura A, Ayukawa Y, Iyama S, Koyano K. Effect of the difference of bone turnover on peri-titanium implant osteogenesis in ovariectomized rats. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70:497-505.
337. Okazaki R, Conover CA, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL. Normal human osteoblast-like cells consistently express genes for insulin-like growth factors I and II but transformed human osteoblast cell lines do not. *J Bone Miner Res*. 1995;10:788-95.
338. Ono T, Kanzaki S, Seino Y, Baylink DJ, Mohan S. Growth hormone (GH) treatment of GH-deficient children increases serum levels of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding protein-3 and -5, and bone alkaline phosphatase isoenzyme. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:2111-6.
339. Orozco P. Actualización en el abordaje y tratamiento de la osteoporosis 2001. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud 2001;25:117-41.
340. Ortoft G, Oxlund H. Qualitative alterations of cortical bone in female rats after long-term administration of growth hormone and glucocorticoid. *Bone*. 1996;18:581-90.
341. Ortolani S. Bone densitometry: assessing the effects of growth hormone treatment in adults. *Horm Res*. 2000;54 Suppl 1:19-23. Review.
342. Osorio F, Varas J y Rodríguez EC. Osteoporosis: Aspectos básicos. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. *Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento*. Madrid: Médica Panamericana; 2003. p. 1-10.
343. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997;89:765-71.
344. Oursler MJ, Pederson L, Pyfferoen J, Osdoby P, Fitzpatrick L, Spelsberg TC. Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. *Endocrinology*. 1993;132:1373-80.
345. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60. Review.
346. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. En: Peck WA, ed. *Bone and Mineral Research*, vol 3. Amsterdam: The Netherlands Elsevier Science Publisher; 1985:1. En: Sodeck J, Cheifetz S. Molecular regulation of osteogenesis. En Davis JE, ed. *Bone engineering*. Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
347. Ozawa S, Ogawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa R, Nishimura D, Nishimura I. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone*. 2002;30:137-43.
348. Panel de expertos. Documento 2003 de la Sociedad Española de Reumatología sobre la osteoporosis posmenopáusica. *Rev Esp Reumatol*. 2003;30:565-71. Descargado de :<http://www.doyma.es>.
349. Pape GS, Friedman M, Underwood LE, Clemmons DR. The effect of growth hormone on weight gain and pulmonary function in patients with chronic obstructive lung disease. *Chest*. 1991;99:1495-500.
350. Parfitt AM. Osteoclast precursors as leukocytes: importance of the area code. *Bone*. 1998;23: 491-4.
351. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*. 1994;55:273-86.
352. Pead MJ, Suswillo RS, Skerry TM, Veda S, Lanyon LE. Increased ³H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic loading in vivo. *Calcif Tissue Int*. 1988;43:92-6.
353. Pereira-Júnior OC, Rahal SC, Iamaguti P, Felisbino SL, Pavan PT, Vulcano LC. Comparison between polyurethanes containing castor oil (soft segment) and cancellous bone autograft in the treatment of segmental bone defect induced in rabbits. *J Biomater Appl*. 2007;21:283-97. Epub 2006 Mar 16.
354. Pérez Casas A, Bengoechea ME. Anatomía funcional del aparato locomotor. Madrid: Paz Montalvo SA; 1978.
355. Pfeilschifter J and Mundy GR. Modulation of transforming growth factor beta activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:2024-8.
356. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1989;4:113-8.
357. Piekarski K and Munro M. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature*. 1977;269:80-2.
358. Petrokovski J. The bony residual ridge in man. *J Prosthet Dent*. 1975;34:456-62.
359. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Ebery S. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest*. 1987;80:706-10.
360. Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop*. 1985;200:87-9.
361. Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 1992. p.1032-45.

362. Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S457-65.
363. Raschke M, Rasmussen MH, Govender S, Segal D, Suntum M, Christiansen JS. Effects of growth hormone in patients with tibial fracture: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:341-51.
364. Reche C, Rodríguez EC, Echevarría R. Repercusiones socioeconómicas y sanitarias de las fracturas osteoporóticas, presentación clínica y diagnóstico. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. *Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento.* Madrid: Médica Panamericana; 2003. p: 21-9.
365. Rechler MM. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm.* 1993;47: 1-114.
366. Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by Bone Morphogenetic Proteins. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S499-502.
367. Reid IR, Ames RW, Orr-Walker BJ, et al. Hydro-chlorothiazide reduces loss of cortical bone in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Am J Med.* 2000;109:362-70.
368. Reyes Balaguer J, Moreno Olmos J. Prevalencia de osteopenia y osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. *Aten Primaria.* 2005;35:342-7.
369. Rickard DJ, Hofbauer LC, Bonde SK, Gori F, Spelsberg TC, Riggs BL. Bone morphogenetics protein-6 production in human osteoblastic cell lines: selective regulation by estrogen. *J Clin Invest.* 1998;101:413-22.
370. Rizzoli R, Bonjour JP. Dietary protein and bone health. *J Bone Miner Res.* 2004;19: 527-31. Epub 2004 Feb 9.
371. Roberts E. Bone Tissue Interface. *J Dental Educat.* 1988;52:804-9.
372. Robinson D, Bab I, Nevo Z. Osteogenic Growth Peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 1995;10:690-6.
373. Robinson JA, Susulic V, Liu YB, Taylor C, Hardenburg J, Girona V, Zhao W, Kharode Y, McLarney S, Bai Y, Malone DP, Murrills R, Bex F. Identification of a PTH regulated gene selectively induced in vivo during PTH-mediated bone formation. *J Cell Biochem.* 2006 Mar 2; [Epub ahead of print]
374. Rocca M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R. Osteointegration of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium screws in long-term ovariectomized sheep. *Biomaterials.* 2002;23:1017-23.
375. Rocca M, Fini M, Giavaresi G, Nicolini Aldini N, Giardino R. Tibial implants: biomechanical and histomorphometric studies of hydroxyapatite-coated and uncoated stainless steel and titanium screws in long-term ovariectomized sheep. *Int J Artif Organs.* 2001;24:649-54.
376. Rodríguez JC, Maestro A, Fournier J, et al. Estudio epidemiológico de las fracturas de extremidad proximal de fémur. *Rev Ortop Traumatol.* 1994;38:349-52.
377. Romanillos JO, Rodríguez EC. Últimas investigaciones ortopédicas sobre osteoporosis y sus posibles aplicaciones prácticas. En: Rodríguez Merchan EC, Ortega Andreu M, Alonso Carro G, eds. *Fracturas osteoporóticas. Prevención y tratamiento.* Madrid: Médica Panamericana; 2003. p. 167-97.
378. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin 6: a potential autocrine/ paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest.* 1992;89:46-52.
379. Rosen CJ, Wüster C. Growth hormone rising: Did we quit too quickly?. *J Bone Miner Res.* 2003 Mar;18(3):406-9.
380. Rosen CJ. Serum-insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins: clinical implications. *Clin Chem.* 1999;45:1384-90.
381. Rosen HN, Chen V, Cittadini A, Greenspan SL, Douglas PS, Moses AC, Beamer WG. Treatment with growth hormone and IGF-I in growing rats increases bone mineral content but not bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 1995 ;10:1352-8.
382. Rosen T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet.* 1990;336:285-8.
383. Rosen T, Eden S, Larson G, Wilhelmsen L, Bengtsson BA. Cardiovascular risk factors in adult patients with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1993;129:195-200.(a)
384. Rosen T, Hansson T, Granhed H, Szucus J, Bengtsson BA. Reduced bone mineral content in adult patients with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1993;129:201-6.(b)
385. Rosen T, Wilhelmsen L, Landin-Wilhelmsen K, Lappas G, Bengtsson BA. Increased fracture frequency in adult patients with hypopituitarism and GH deficiency. *Eur J Endocrinol.* 1997;137:240-5.
386. Rudling M, Norstedt G, Olivecrona H, Reihner E, Gustafsson JA, Angelin B. Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:6983-7.
387. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Roudman IW, Mattson DE. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med.* 1990;323:1-6.
388. Russell RGG. The assessment of bone metabolism in vivo using biochemical approaches. *Horm Metab Res.* 1997;29:138-44.
389. Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinology.* 1985;116:2563-8.
390. Saban J, Schneider GB, Bolt D, King D. Erythroid-specific expression of human growth hormone affects bone morphology in transgenic mice. *Bone.* 1996;18:47-52.
391. Sabatini M, Boyce B, Aufdemorte T, Bonewald L, Mundy GR. Infusions of recombinant human interleukin-1 alpha and beta cause hypercalcemia in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:5235-9.
392. Saggese G, Baroncelli G, Federico G, Bertelloni S. Effects of Growth Hormone on phosphocalcium homeostasis and bone metabolism. *Horm Res.* 1995;44 (suppl 3):55-63.
393. Saggese G, Baroncelli G, Federico G, Bertelloni S. Effects of Growth Hormone on phosphocalcium homeostasis and bone metabolism. *Horm Res.* 1995;44 Suppl 3:55-63.
394. Saintier D, Khanine V, Uzan B, Ea HK, de Vernejoul MC, Cohen-Solal ME. Estradiol inhibits adhesion and promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro.
395. Salles JP, Netelenbos JC, Slootweg MC. Growth hormone induces tyrosine phosphorylation of annexin I in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1996;137:4358-62.
396. Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sonksen PH. The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N Engl J Med.* 1989;321:1797-803.
397. Sanchez CP, Goodman WG, Brandli D, Goldenhersh M, Murray C, Carlton E, Hahn T, Salusky IB. Skeletal response to recombinant human growth hormone (rhGH) in children treated with long-term corticosteroids. *J Bone Miner Res.* 1995;10:2-6.
398. Sandstedt J, Ohlsson C, Norjavaara E, Nilsson J, Tornell J. Disproportional bone growth and reduced weight gain in gonadectomized male bovine growth hormone transgenic and normal mice. *Endocrinology.* 1994;135:2574-80.
399. Santoro NF, Col NF, Eckman MH, Wong JB, Paulker SG, Cauley JA, Zmuda J, et al. Therapeutic controversy: Hormone replacement therapy--where are we going?. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1798-812.

400. Sarnat H, Kaplan I, Pertzelan A, Laron Z. Comparison of dental findings in patients with isolated growth hormone deficiency treated with human growth hormone and intreated patients with Laron-type dwarfism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;66:581-6.
401. Sass DA, Jerome CP, Bowman AR, Bennett-Cain A, Ginn TA, LeRoith D, Epstein S. Short-term effects of growth hormone and IGF-I on cancellous bone formation in Rhesus Macaque monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1202-9.
402. Schmid C. Growth hormone replacement therapy. Clues and claims. *Acta Endocrinol.* 1993;129:185-7.
403. Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants.* 2006;16:61-9. Review.
404. Schmidt C, Priemel M, Kohler T, Weusten A, Muller R, Amling M, Eckstein F. Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (microCT). *J Bone Miner Res.* 2003;18:1486-96.
405. Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res.* 1997;48 Suppl 5:50-9.
406. Schreiweis MA, Orban JI, Ledur MC, Hester PY. The use of densitometry to detect differences in bone mineral density and content of live White Leghorns fed varying levels of dietary calcium. *Poult Sci.* 2003;82:1292-301.
407. Schweizer R, Martin DD, Schwarze CP, Binder G, Georgiadou A, Ihle J, Ranke MB. Cortical bone density is normal in prepubertal children with growth hormone (GH) deficiency, but initially decreases during GH replacement due to early bone remodeling. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5266-72.
408. Seckinger P, Klein-Nulend J, Alander C, Thompson RC, Dayer JM, Raisz LG. Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production. *J Immunol.* 1990;145:4181-4.
409. Serrano Cuenca V, Casas Hernández A. Factores de crecimiento: ¿Un nuevo enfoque terapéutico?. *Periodoncia.* 1997;7:99-115.
410. Sherlock M, Toogood AA. Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis. *Pituitary.* 2007;10:189-203.
411. Siejka A, Stepień T, Lawnicka H, Krupinski R, Komorowski J, Stepień H. Effect of the growth hormone-releasing hormone [GHRH(1-44)NH₂] on IL-6 and IL-8 secretion from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Endocr Regul.* 2005;39:7-11.
412. Sievänen H, Kannus P, Järvinen M. Precision of measurement by dual-energy X-ray absorptiometry of bone mineral density and content in rat hindlimb in vitro. *J Bone Miner Res.* 1994;9:473-8.
413. Singh K, Smucker JD, Gill S, Boden SD. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct in posterolateral lumbar spine fusion: a prospective CT-scan analysis at one and two years. *J Spinal Disord Tech.* 2006;19:416-23. Erratum in: *J Spinal Disord Tech.* 2007;20:185. Gill, Sanjitpal [added].
414. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennet L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliot R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89: 309-19.
415. Slootweg MC, Hoogerbrugge CM, de Poorter TL, Duursma SA, van Buul-Offers SC. The presence of classical insulin-like growth factor (IGF) type-I and -II receptors on mouse osteoblasts: autocrine/paracrine growth effect of IGFs?. *J Endocrinol.* 1990;125:271-7.
416. Slootweg MC, Ohlsson C, Salles JP, de Vries CP, Netelenbos JC. Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1995;136:4210-7.
417. Slootweg MC, Ohlsson C, van Elk EJ, Netelenbos JC, Andress DL. Growth hormone receptor activity is stimulated by insulin-like growth factor binding protein 5 in rat osteosarcoma cells. *Growth Regul.* 1996;6:238-46.
418. Slootweg MC, Swolin D, Netelenbos JC, Isaksson OG, Ohlsson C. Estrogen enhances growth hormone receptor expression and growth hormone action in rat osteosarcoma cells and human osteoblast-like cells. *J Endocrinol.* 1997;155:159-64.
419. Slootweg MC, Van Buul-Offers SC, Hermann-Erlee MPM, Van der Meer JM, Duursma SA. Growth hormone is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. *J Endocrinol.* 1988;116:R11-3.
420. Slootweg MC. Growth hormone and bone. *Horm Metab Res.* 1993;25:335-43.
421. Slotte C, Lundgren D, Sennerby L, Lundgren AK. Influence of preimplant surgical intervention and implant placement on bone wound healing. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:528-34.
422. Smith D, Gowen M, Mundy GR. Effects of interferon gamma and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology.* 1987;120:2494-9.
423. Sociedad Española de Geriátría y Gerodontología. Decálogo de la SEGG para prevenir y tratar la osteoporosis en las personas mayores. *Jano On-line.* 20/10/2005.
424. Sodeck J, Cheifetz S. Molecular regulation of osteogenesis. En: Davis JE, ed. *Bone engineering.* Toronto: Davis JE; 2000.p.31-43.
425. Spagnoli A, Rosenfeld RG. The mechanisms by which growth hormone brings about growth. The relative contributions of growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996;25:615-31.
426. Steinberg TH, Civitelli, Geist ST, Robertson AJ, Hick E, Veenstra RD, Wang H-Z, Warlow PM, Westphale EM, Laing JG, Beyer EC. Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* 1994;13:744-50.
427. Stenport VF, Olsson B, Morberg P, Tornell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2001;3:135-41.
428. Stracke H, Schultz A, Maeller D, Rossol S, Schatz H. Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF-I in bone organ culture. *Acta Endocrinol.* 1984;107:16-24.
429. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res.* 1997;12:869-79.
430. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone.* 2004;35(4):828-35.
431. Swegle JM, Kelly MW. Tibolone: a unique version of hormone replacement therapy. *Ann Pharmacother.* 2004;38:874-81.
432. Sykaras N y Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician?. *J Oral Sci.* 2003;45:57-73.
433. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90: 11924-8.
434. Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, Burr DB, Turner CH, Yokota H. Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. *Calcif Tissue Int.* 2005;76:261-71.
435. Tatakis D. Interleukin-1 and Bone Metabolism: A Review. *J Periodontol.* 1993;64:416-31.

436. Taub DD, Tsarfay G, Lloyd AR, Scott KD, Longo DL, Murphy WJ. Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogenic engraftment. *J Clin Invest.* 1994;94:293-300.
437. Teng Chung T, Hinds CJ. Treatment with GH and IGF-1 in critical illness. *Crit Care Clin.* 2006;22:29-40, vi. Review.
438. Thacker JD, Dedhar S, Hogge DE. The effect of GM-CSF and G-CSF on the growth of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 1994;56: 236-43.
439. Theyse LF, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van Doorn J, Terlouw M, Mol JA, Voorhout G, Hazewinkel HA. Expression of osteotropic growth factors and growth hormone receptor in a canine distraction osteogenesis model. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:266-73.
440. Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med.* 1986;164:104-12.
441. Thoren M, Soop M, Degerblad M, Saaf M. Preliminary study of the effects of growth hormone substitution therapy on bone mineral density and serum osteocalcin levels in adults with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1993;128:41-3.
442. Toogood AA. The somatopause: an indication for growth hormone therapy? *Treat Endocrinol.* 2004;3:201-9. Review.
443. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JA. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:193-202.
444. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:807-11.
445. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Impl Res.* 2002;13:623-30.
446. Tresguerres IF. Influencia de la hormona de crecimiento en la osteointegración. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, 1999.
447. Tresguerres JAF, Somatomedinas. En: Moreno Esteban B, Tresguerres JAF, eds. Retrasos del crecimiento, fisiopatología. Madrid: Díaz de Santos SA; 1992. p. 55-68.
448. Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Experimental Gerontology.* 2003;38:605-14.
449. Tseng KF, Bonadio JF, Stewart TA, Baker AR, Goldstein SA. Local expression of human growth hormone in bone results in impaired mechanical integrity in the skeletal tissue of transgenic mice. *J Orthop Res.* 1996;14:598-604.
450. Tsutsumi H, Katagiri K, Takeda S, Nasu T, Igarashi S, Tanigawa M, Mamba K. Standardized data and relationship between bone growth and bone metabolism in female Gottingen minipigs. *Exp Anim.* 2004;53:331-7.
451. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater.* 2001;1:66-81.
452. Turner RT. Effects of short-term spaceflight and recombinant human growth hormone (rhGH) on bone growth in young rats. *Aviat Space Environ Med.* 1995;66:763-9. Abstract.
453. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone.* 1999;25:517-23.
454. Ulrich-Vinther M. Gene therapy methods in bone and joint disorders. Evaluation of the adeno-associated virus vector in experimental models of articular cartilage disorders, periprosthetic osteolysis and bone healing. *Acta Orthop Suppl.* 2007;78:1-64. Review.
455. Valk NK, Erdtsieck RJ, Algra D, Lamberts SW, Pols HA. Combined treatment of growth hormone and the bisphosphonate pamidronate, vs. treatment with GH alone, in GH-deficient adults: the effects on renal phosphate handling, bone turnover and bone mineral mass. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 1995;43:317-4.
456. Van de Weghe M, Taelman P, Kaufman JM. Short and long-term effects of growth hormone treatment on bone turnover and bone mineral content in adult growth hormone deficient males. *Clin Endocrinol.* 1993;39:409-15.
457. Veitch SW, Findlay SC, Ingle BM, Ibbotson CJ, Barrington A, Hamer AJ, Eastell R. Accuracy and precision of peripheral quantitative computed tomography measurements at the tibial metaphysis. *J Clin Densitom.* 2004;7:209-17.
458. Verhaeghe J, van Bree R, Van Herck E, Thomas H, Skottner A, Dequeker J, Mosekilde L, Einhorn TA, Bouillon R. Effects of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor-I, with or without 17 beta-estradiol, on bone and mineral homeostasis of aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1723-35.
459. Wang X-F, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell.* 1991;67:797-805.
460. Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ. Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H₂O₂. *J Immunol.* 1995;154:1909-18.
461. Weinand C, Gupta R, Huang AY, Weinberg E, Madisch I, Qudsi RA, Neville CM, Pomerantseva I, Vacanti JP. Comparison of hydrogels in the in vivo formation of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and beta-tricalcium phosphate. *Tissue Eng.* 2007;13:757-65.
462. Weber HP, Fiorellini JP, Paquette DW, Howell TH, Williams RC. Inhibition of peri-implant bone loss with the nonsteroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen in beagle dogs. A preliminary study. *Clin Oral Impl Res.* 1994;5:148-53.
463. Weisbroth SH, Fudens JH. Use of ketamine hydrochloride as an anesthetic in laboratory rabbits, rats, mice and guinea pigs. *Laboratory Animal Science.* 1972;22:904-6.(artículo)
464. Weiss S, Henle P, Bidlingmaier M, Moghaddam A, Kasten P, Zimmermann G. Systemic response of the GH/IGF-I axis in timely versus delayed fracture healing. *Growth Horm IGF Res.* (2007), doi:10.1016/j.ghir.2007.09.002
465. Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology.* 2^a ed. New York: Churchill Livingstone 1987.
466. White SC, Taguchi A, Kao D, Wu S, Service SK, Yoon D, et al. Clinical and panoramic predictors of femur bone mineral density. *Osteoporos Int.* 2005;16:339-46.
467. Whitehead HM, Boreham C, McIlrath EM, Sheridan B, Kennedy L, Atkinson AB, Hadden DR. Growth hormone treatment of adults with growth hormone deficiency: results of a 13-month placebo controlled cross-over study. *Clin Endocrinol.* 1992;36:45-52.
468. WHO. Assessment of osteoporotic fracture risk and its role in screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series num 843, Génova 1994.
469. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Reddy MS, Johnsons HG, Hall CM, Goldhaber P. Ibuprofen: an inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *J Periodont Res.* 1988;23:225-9.
470. Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, Goldhaber P, Johnson HG, Wechter WJ. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science.* 1985;227:640-2.

471. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu CP, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA: Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo Journal*. 2003;22:6267-76.
472. Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C, Latham JA. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*. 2005;280:2498-502. Epub 2004 Nov 12.
473. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick HM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242:1528-34.
474. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventrua F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994;370:341-7.
475. Wright NM, Papadea N, Veldhuis JD, Bell NH. Growth hormone secretion and bone mineral density in prepubertal black and white boys. *Calcif Tissue Int*. 2002;70:146-52. Epub 2002 Feb 15.
476. Wright NM, Renault J, Willi S, Veldhuis JD, Pandey JP, Gordon L. Greater secretion of growth hormone in black than in white men: possible factor in greater bone mineral density. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:2291-7.(a)
477. Wright NM, Renault J, Hollis B, Bell NH, Key LL. Effect of growth hormone on bone: bone mineral density, trabecular bone volume, and alkaline phosphatase improve or are restored in the dwarf rat treated with growth hormone. *J Bone Miner Res*. 1995;10:127-31. (b)
478. Wüster C, Harle U, Rehn U, Muller C, Knauf K, Koppler D, Schwabe C, Ziegler R. Benefits of growth hormone treatment on bone metabolism, bone density and bone strength in growth hormone deficiency and osteoporosis. *Growth Horm IGF Res*. 1998;8 Suppl A:87-94. Review.
479. Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, Motohashi M, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 1999;87:411-8.
480. Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent*. 2005;33:123-9.
481. Yasuda I. Fundamental aspects of fracture treatment. *Clin Orthop*. 1977;124:5-8.
482. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*. 1990;345:442-4.
483. Zang XY, Tan YB, Pang ZL, Zhang WZ, Zhao J. Effects of parathyroid hormone and estradiol on proliferation and function of human osteoblasts from fetal long bone. An in vitro study. *Chin Med J (Engl)*. 1994;107:600-3.
484. Zarychanski R, Elphee E, Walton P, Johnston J. Osteonecrosis of the jaw associated with pamidronate therapy. *Am J Hematol*. 2006;81:73-5.
485. Zhang R, An Y, Toth CA, Draughn RA, Dimaano NM, Hawkins MV. Osteogenic protein-1 enhances osseointegration of titanium implants coated with peri-apatite in rabbit femoral defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71:408-13.
486. Zhu T, Goh EL, LeRoith D, Lobie PE. Growth hormone stimulates the formation of a multiprotein signaling complex involving p130(Cas) and CrkII. Resultant activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem*. 1998;273:33864-75.